

**ALINE IGNACIO SILVESTRE DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DE ALGUNS MICRORGANISMOS DA MICROBIOTA INTESTINAL  
ENDÓGENA DE CRIANÇAS EUTRÓFICAS, COM SOBREPESO E OBESAS EM  
IDADE ESCOLAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2014

**ALINE IGNACIO SILVESTRE DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DE ALGUNS MICRORGANISMOS DA MICROBIOTA INTESTINAL  
ENDÓGENA DE CRIANÇAS EUTRÓFICAS, COM SOBREPESO E OBESAS EM  
IDADE ESCOLAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nakano

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Aline Ignacio Silvestre da.

Avaliação de alguns microrganismos da microbiota intestinal endógena de crianças eutróficas, com sobrepeso e obesas em idade escolar / Aline Ignacio Silvestre da Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa, Dra. Viviane Nakano.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bacteriologia de anaeróbios.

Versão do título para o inglês: Evaluation of some microorganism from endogenous intestinal microbiota of normal weight, overweight and obese schoolchildren.

1. Microbiota intestinal 2. Obesidade 3. Crianças 4. Bacteroides  
5. Clostridium 6. PCR quantitativo I. Nakano, Profa. Dra. Viviane  
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB031/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Aline Ignacio Silvestre da Silva.

Título da Dissertação: Avaliação de alguns microrganismos da microbiota intestinal endógena de crianças eutróficas, com sobrepeso e obesas em idade escolar.

Orientador(a): Profa. Dra. Viviane Nakano.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

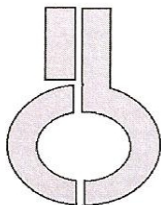
**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 19 de abril de 2012.

**PARECER 1043/CEP**

A Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 18.04.2012, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Avaliação de alguns microorganismos da microbiota intestinal endógena de crianças eutróficas, obesas e com sobrepeso em idade escolar*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. **MARIO JÚLIO ÁVILA CAMPOS** e a aluna **ALINE IGNACIO SILVESTRE DA SILVA**, *com recomendação de que sejam adotadas medidas, como descrição e sigilo por ocasião da coleta de material, para que as crianças não sofram discriminação.*

*Informa ainda, que seu projeto será regularizado junto a Plataforma Brasil, assim que a CONEP liberar o acesso ao sistema.*

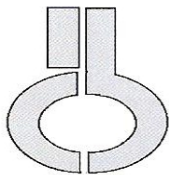
Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **18.03.2013**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A.ZANOTTO

Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

COMISSÃO DE ÉTICA NO EM PESQUISA

Decl. CEP SH. 019/2013.

## D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao **PARECER 1043/CEP**, referente ao Projeto ao intitulado: "*Avaliação de alguns microorganismos da microbiota intestinal endógena de crianças eutróficas, obesas e com sobrepeso em idade escolar*" da aluna **Aline Ignacio Silvestre da Silva**, informo que desde 17.05.2012, passou sob a orientação da Profa. Dra. **Viviane Nakano**, sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 30 de abril de 2013.

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO  
Coordenador da CEP SH- ICB /USP

*À minha amada família:*

*mãe Regina e pai Eduardo, que me ensinaram que o que aprendemos é a única coisa verdadeiramente nossa,*

*irmã Cynthia, por todo incentivo e apoio,*

*tia avó Má, por todo amor e carinho,*

*padrinhos Egle e Douglas, que são verdadeiros segundos pais para mim,*

*meu Pedro, que me faz querer mais da vida, mais de mim e mais de nós.*

*Dedico a vocês mais uma conquista.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao meu anjo da guarda, pela vida cheia de alegrias e por toda proteção.

Ao professor Dr. Mario Julio Avila-Campos, que ainda na graduação abriu as portas do seu laboratório para o início da minha vida acadêmica e permitiu a realização de mais um trabalho. Muito obrigada por muitas vezes ter me instigado e desafiado, fazendo com que eu reconhecesse e quisesse superar minhas falhas, essencial para o meu aprimoramento profissional.

À professora Dra. Viviane Nakano, que antes mesmo de ser oficialmente minha orientadora sempre contribuiu com seus conhecimentos para a minha formação, com respeito e amizade sincera. Obrigada por ter ouvido com paciência e atenção cada frase “Sabe o que eu estava pensando...” e ter discutido comigo cada questionamento que vinha à minha mente.

Ao Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP, ao professor Dr. Ary Cardoso Lopes e funcionários; e as Escolas E. E. Clorinda Dante, Creche Maria de Nazaré e Colégio Trentus e seus Diretores Educacionais, Professores e funcionários que colaboraram com as coletas das amostras de fezes.

Aos pais e responsáveis das crianças do Instituto da Criança e das Escolas que gentilmente aprovaram a coleta de amostras fecais de suas crianças para a realização deste estudo.

À professora Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, pela disponibilidade e colaboração nos experimentos de citotoxicidade em culturas celulares.

Ao Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, ao Prof. Dr. Sydney Finegold do Veterans Affairs LA Medical Center da Universidade da Califórnia, Los Angeles, ao Dr. Glenn Songer da Universidade do Arizona e ao Dr. Rob Moore da Universidade de Monash, Austrália, pelo fornecimento das cepas bacterianas padrão utilizadas neste estudo.

Ao professor Dr. Francisco Carlos Groppo, do Departamento de Farmacologia da Unicamp, e a Sra. Rosana Duarte Prico do ICB/USP, por suas contribuições nas análises estatística deste trabalho.

À minha querida amiga Miriam Rodriguez Fernandes, minha escudeira fiel, parceira de todas as horas. Obrigada por ter trabalhado ao meu lado e sempre oferecido sua ajuda. Esta jornada foi sem dúvida mais fácil por você ter feito parte dela e que seja a primeira de muitas outras que caminharemos juntas.



Às minhas dentistas preferidas e colegas de laboratório Sheila Belini e Viviane Arenas, por toda amizade, carinho e conhecimentos divididos.

Ao meu querido amigo Luis Llanco. Sua disposição em ajudar e sua alegria de trabalhar fez meus dias mais leves e passíveis de ultrapassar qualquer obstáculo.

Aos demais colegas do Laboratório de Anaeróbios, Thais Wahasugui, Rafael Castillo, Alfredo Feitosa e Zulmira Alves, que deixaram lembranças e aos amigos que continuarão sua caminhada, Naiane Cardoso, Gisela Pereira, Rafael Nascimento e Bruna Bizerril.

À Marcia Harumi, por todo apoio e auxílio técnico que me foram dados com respeito e amizade, fazendo de você nada menos do que uma de nós.

Aos meus estimados amigos cientistas da saúde, André Bento, Magna Magalhães, Bruna Zelante, Clarissa Ribeiro, Leonardo Novaes, Ranan Antonialli e Wesley Fotoran, por todos os momentos de amizade e enriquecimento intelectual. Orgulho-me muito de fazer parte desta turma!

Aos professores do Departamento de Microbiologia do ICB/USP, pelos conhecimentos transmitidos que contribuíram para o aprimoramento da minha formação profissional.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia, Gisele da Graça Santana, Naíde Rodrigues e Elizabete dos Santos, por seus préstimos e auxílio constante.

Às bibliotecárias Sras. Delza Piruna, Jacinta de Oliveira, Renata Maria dos Santos, Tereza Cristina Soutto Mayor, por toda atenção dedicada para a elaboração dessa dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio concedido (2008/57330-4) possibilitando a realização deste trabalho em seu âmbito técnico e intelectual e pela bolsa (2012/10659-7) outorgada durante estes dois anos de Mestrado.

Por fim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para o cumprimento de mais uma etapa. Muito obrigada!

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

SILVA, A. I. S. **Avaliação de alguns microrganismos da microbiota intestinal de crianças eutróficas, com sobrepeso e obesas em idade escolar.** 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O trato gastrointestinal é um ecossistema extremamente complexo. Diversos fatores influenciam o processo de colonização como: tipo de parto e de alimentação e o uso precoce de antimicrobianos. Em adultos, a maioria das bactérias encontradas na microbiota intestinal é pertencente aos gêneros *Bacteroides*, *Parabacteroides* (*Bacteroidetes*) e *Clostridium* (*Firmicutes*). Atualmente a obesidade é considerada uma das principais doenças de saúde pública e sua relação com a microbiota intestinal passou a ser discutida recentemente. No Brasil, os índices de obesidade vêm alarmando a comunidade médica, principalmente em se tratando de obesidade infantil onde tem sido observado um crescimento vertiginoso dos casos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente alguns microrganismos que compõe a microbiota intestinal endógena de crianças eutróficas (30), com sobrepeso (24) e obesas (30) entre 3 a 11 anos, a partir de amostras fecais. Foi realizado o isolamento de espécies de *Clostridium*, *Bacteroides* e *Parabacteroides*; a identificação de *B. fragilis* e *C. perfringens* enterotoxigênicos; e a detecção quantitativa por PCR (SybrGreen) de *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *P. distasonis*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroidales* e *Clostridium* (cluster I). Adicionalmente, no ato da coleta foi aplicado um questionário a respeito do tipo de parto, tipo de amamentação, uso de antibiótico na tentativa de correlacionar com os resultados quantitativos obtidos com essas variáveis qualitativas. Os nossos resultados mostraram que a média de idade para as crianças obesas e com sobrepeso corresponde aos 8 anos, enquanto eutróficas apresentaram média de 6 anos de idade; as espécies de *C. perfringens* e *B. vulgatus* foram as mais isoladas em todos os grupos estudados. Nenhum dos isolados de *B. fragilis* foi enterotoxigênico; todos os isolados de *C. perfringens* foram classificados como tipo A e destes 8,7% e 12,2% albergaram os genes *tepL* e *netB*, respectivamente, sendo que alguns isolados produziram efeito citotóxico em células Vero. Pelo método de isolamento observou-se que o grupo dos sobrepeso teve maior diversidade de espécies isoladas; e no grupo dos obesos foram observados o maior número de isolados (175) em relação ao grupo dos eutróficos (112) e sobrepeso (120). A análise quantitativa revelou que *C. perfringens*, *C. difficile* e *Bifidobacterium* spp. estão em maior quantidade em crianças eutróficas, enquanto que obesos e com sobrepeso apresentaram maior número de *Lactobacillus* spp. e *Bacteroidales*. Nenhuma das variáveis qualitativas apresentou associação com o estado nutricional da criança bem como os resultados obtidos no qPCR. Outros estudos devem ser realizados para melhor compreensão do papel da microbiota sobre o ganho de peso, principalmente em crianças.

**Palavras-chave:** Microbiota intestinal. Obesidade. Crianças. *Bacteroides*. *Clostridium*. PCR quantitativo.

## ABSTRACT

SILVA, A. I. S. **Evaluation of some microorganism from endogenous intestinal microbiota of normal weight, overweight and obese schoolchildren.** 2014. 86 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The intestinal tract is a complex ecosystem. Several factors can influence the process of colonization as: type of delivery and supply and the early use of antimicrobials. In adults, the majority of the bacteria found in gut are belonging to the genera *Bacteroides*, *Parabacteroides* (*Bacteroidetes*) and *Clostridium* (*Firmicutes*). Currently obesity is considered one of the main diseases of public health and its relationship with the intestinal microbiota has been discussed recently. In Brazil, the rates of obesity have become worrying especially in the case of childhood obesity where there has been a rapid growth of cases. The goal of this study was to evaluate some microorganism from endogenous intestinal microbiota of normal weight (30), overweight (24) and obese children between 3 and 11 years, from fecal samples. It was performed the isolation of species of *Bacteroides*, *Parabacteroides* and *Clostridium*; the identification of *B. fragilis* and *C. perfringens* enterotoxigenic; and the quantitative detection by PCR (SybrGreen) *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *P. distasonis*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroidales* and *Clostridium* (cluster I). Additionally, a survey about the type of delivery, type of breastfeeding and the use of antibiotics was applied to correlate with the quantitative results obtained with these qualitative variables. Our results showed that the average age for obese and overweight children corresponds to 8 years, while normal weight had a mean age of 6 years; the species of *C. perfringens* and *B. vulgatus* were the most isolated. No *B. fragilis* isolated was enterotoxigenic; all *C. perfringens* were classified as type A and these 8.7% and 12.2% harbored *tpeL* and *netB* genes, respectively, and some of them produce cytotoxic effect in Vero cells. The overweight group had highest species diversity and obese group had the highest isolate number (175) compared with normal weight (112) and overweight (120) group. *C. perfringens*, *C. difficile* and *Bifidobacterium* spp. were in greater quantity in normal weight children while that obese and overweight showed a greater number of *Lactobacillus* spp. and *Bacteroidales*. None of the qualitative variables were significantly associated with the nutritional status of the children as well as the results obtained in qPCR. Other studies should be conducted to better understand the role of microbiota on weight gain, especially in children.

**Keywords:** Intestinal microbiota. Obesity. Children. *Bacteroides*. *Clostridium*. Quantitative PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Modelo hipotético de como as bactérias intestinais da mãe poderiam atravessar à placenta e chegar à glândula mamária.....	24
<b>Figura 2</b> - Interações entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro.....	29
<b>Figura 3</b> - Cepas distintas de <i>B. fragilis</i> baseado na presença da ilha BfPAI e sua região franqueadora.....	31
<b>Figura 4</b> - Evolução da prevalência de excesso de peso em crianças e adolescentes no Brasil.....	36
<b>Figura 5</b> - Curva padrão <i>B. fragilis</i> ATCC 25285.....	49
<b>Figura 6</b> - Curva padrão <i>B. vulgatus</i> ATCC 8482.....	49
<b>Figura 7</b> - Curva padrão <i>P. distasonis</i> ATCC 8503.....	49
<b>Figura 8</b> Curva padrão <i>P. merdae</i> ATCC 43184.....	50
<b>Figura 9</b> - Curva padrão <i>C. perfringens</i> ATCC 13124.....	50
<b>Figura 10</b> - Curva padrão <i>C. difficile</i> VPI 10468.....	50
<b>Figura 11</b> - Curva padrão <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 1696.....	50
<b>Figura 12</b> - Curva padrão <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC4356.....	51
<b>Figura 13</b> - Curva padrão Cluster I ( <i>C. perfringens</i> ATCC 13124).....	51
<b>Figura 14</b> - Curva padrão <i>Bacteroides</i> spp. ( <i>B. fragilis</i> ATCC 25285).....	51
<b>Figura 15</b> - Detecção do gene <i>bft</i> da fragilisina.....	57
<b>Figura 16</b> - Determinação dos padrões <i>B. fragilis</i> não-enterotoxigênico (NTBF).....	57
<b>Figura 17</b> - Multiplex dos toxinotipos <i>C. perfringens</i> .....	58
<b>Figura 18</b> - Detecção do gene <i>tpeL</i> em isolados de <i>C. perfringens</i> .....	58
<b>Figura 19</b> - Efeito citotóxico de <i>C. perfringens tpeL<sup>+</sup>/plc<sup>+</sup></i> em células Vero.....	59
<b>Figura 20</b> - Detecção do gene <i>netB</i> em isolados de <i>C. perfringens</i> .....	60
<b>Figura 21</b> - Efeito citotóxico de <i>C. perfringens netB<sup>+</sup>/plc<sup>+</sup></i> em células Vero.....	60

## LISTA DE TABELAS E QUADRO

<b>Tabela 1</b> - Classificação dos toxintipos de <i>C. perfringens</i> .....	33
<b>Quadro 1</b> - Tabela de escore z empregado na classificação das crianças.....	40
<b>Tabela 2</b> - Sequências oligonucleotídicas para detecção de <i>Bacteroides fragilis</i> toxigênico e não-toxigênico.....	44
<b>Tabela 3</b> - Sequências de oligonucleotídeos para detecção dos genes produtores de toxinas em <i>C. perfringens</i> .....	46
<b>Tabela 4</b> - Sequências de oligonucleotídeos para amplificação por qPCR SybrGreen.....	52
<b>Tabela 5</b> - Características das amostras em estudo.....	54
<b>Tabela 6</b> - Frequência relativa das espécies dos gêneros <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i> isoladas entre os grupos.....	55
<b>Tabela 7</b> - Frequência relativa das espécies de <i>Clostridium</i> isoladas entre os grupos.....	56
<b>Tabela 8</b> - Quantificação por PCR em Tempo-Real das amostras fecais.....	61
<b>Tabela 9</b> - Correlação de Spearman (rS) e nível de significância (valor de $p$ ) entre algumas variáveis estudadas.....	63
<b>Tabela 10</b> - Correlação de Spearman (rS) e nível de significância (valor de $p$ ) entre as bactérias estudadas.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TGI – Trato gastrintestinal

SCFAs - *Short-chain fatty acids*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

GALT - *Gut-associated lymphoid tissue*

BfPAI - *Bacteroides fragilis pathogenicity island*

BFT – *Bacteroides fragilis* toxin

PCR – Reação em cadeia da polimerase

ETBF - *B. fragilis* enterotoxigênico

NTBF - *Bacteroides fragilis* não-enterotoxigênico

TpeL - *Toxin Clostridium perfringens large cytotoxin*

NetB - *Necrotic Enteritis Toxin B-like*

VERO - Células epiteliais de rim de macaco verde

qPCR – PCR quantitativo

WHO – *World Health Organization*

IMC - Índice da Massa Corporal

OMS - Organização Mundial da Saúde

POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares

AME - Amamentação materna exclusiva nos primeiros seis meses de vida

AM – Amamentação materna pelo menos nos primeiros seis meses de vida

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3 ANÁLISE DA LITERATURA</b> .....	22
<b>3.1 Colonização do trato gastrointestinal</b> .....	22
<b>3.2 Composição da microbiota intestinal humana</b> .....	27
3.2.1 <i>Crianças versus adultos</i> .....	27
3.2.2 <i>Bacteroidetes</i> .....	29
3.2.3 <i>Firmicutes</i> .....	32
<b>3.3 Obesidade</b> .....	34
<b>3.4 Obesidade e a microbiota intestinal endógena</b> .....	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
<b>4.1 Grupos estudados</b> .....	40
<b>4.2 Coleta dos espécimes clínicos e isolamento bacteriano</b> .....	41
<b>4.3 Identificação bacteriana</b> .....	41
<b>4.4 Extração de DNA</b> .....	42
4.4.1 <i>Extração de DNA cromossômico</i> .....	42
4.4.2 <i>Extração de DNA total das fezes</i> .....	42
<b>4.5 Avaliação das cepas de <i>B. fragilis</i> enterotoxigênicas</b> .....	43
4.5.1 <i>Deteção por PCR do gene bft em isolados B. fragilis</i> .....	43
4.5.2 <i>Deteção por PCR dos padrões não-enterotoxigênico de B. fragilis isolados</i> .....	43
<b>4.6 Avaliação das cepas de <i>C. perfringens</i> toxigênicas</b> .....	44
4.6.1 <i>Determinação dos toxinotipos de isolados C. perfringens por PCR Multiplex</i> .....	44
4.6.2 <i>Deteção por PCR do gene tpeL em isolados C. perfringens</i> .....	45



4.6.3 Detecção por PCR do gene <i>netB</i> em isolados <i>C. perfringens</i> .....	46
4.6.4 Sequenciamento dos genes <i>tpel</i> e <i>netB</i> .....	47
4.6.5 Detecção do efeito citotóxico em células VERO.....	47
<b>4.7 Análises quantitativas das amostras fecais: PCR quantitativo (SybrGreen)</b> .....	<b>48</b>
<b>4.8 Análises estatísticas</b> .....	<b>52</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXO A</b> Questionário.....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O trato gastrintestinal (TGI) é um ecossistema extremamente complexo que envolve as condições físicas do hospedeiro, a dieta alimentar, os sistemas fisiológico e imunológico e as interações com as diversas espécies microbianas. Os microrganismos que residem de forma estável no ambiente intestinal constituem a microbiota residente, também denominada microbiota endógena ou autóctone, que atua como primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão e proliferação de organismos exógenos e oportunistas (HOOPER; BRY; GORDON, 1998).

Durante muitos anos, acreditou-se que um feto saudável se desenvolve em um ambiente estéril e que a colonização do TGI se iniciava durante o nascimento. Este conceito amplamente aceito se deve principalmente a observação e forte correlação entre a ocorrência de partos prematuros acompanhados de infecções intra-uterinas (GOLDENBERG; HAULTH; ANDREWS, 2000; GONÇALVES; CHAIWORAPONGSA; ROMERO, 2002). Entretanto, estudos sobre o ambiente uterino saudável mostraram a presença de algumas espécies, como *E. faecium*, *S. epidermidis*, *P. acnes*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium* spp., no sangue do cordão umbilical e anexos placentários (DiGIULIO et al., 2005; JIMENÉZ et al., 2005; SATOKARI et al., 2009). Assim, acredita-se que algumas bactérias iniciam a colonização do intestino do feto como uma forma de adaptá-lo à vida fora do útero e posteriormente, o processo continua durante e após o parto e com a amamentação (JIMENÉZ et al., 2008).

Diversos fatores são determinantes para a colonização do trato gastrintestinal: ao nascer de parto normal, as primeiras bactérias que colonizam o intestino são as provenientes do canal vaginal e períneo da mãe, sendo a maioria anaeróbia; diferentemente, em partos cesáreas, a microbiota que se instala primeiramente é caracterizada por microrganismos microaerófilos, facultativos e esporulados provenientes do ambiente e dos profissionais da área de saúde (BEZIRTZOGLOU, 1997).

Outro fator importante que influencia o processo de colonização intestinal nos primeiros meses de vida é a alimentação. O leite materno é composto por lactose, caseína, cálcio e fosfato; e possui baixo poder tamponante que favorece o desenvolvimento de *Bifidobacterium* spp.. Acredita-se que espécies *Bifidobacterium* inibem a proliferação de *E. coli* e alguns anaeróbios como *Bacteroides* spp. e

*Clostridium* spp., devido à síntese de grandes quantidades de ácido acético, prevenindo assim quadros de gastroenterites (BEZIRTZOGLOU, 1997).

O uso de antibióticos também merece destaque; a antibióticoterapia precoce é muitas vezes empregada na prevenção de enfermidades, em casos de nascimento prematuro, uma vez que a hospitalização permite a exposição a possíveis agentes patogênicos, que para um sistema imune imaturo, pode ser fatal. Estudos mostram que o uso de antibióticos nos primeiros meses de vida diminui a diversidade microbiana, favorecendo a instalação de *S. aureus* e *Klebsiella* spp. nos primeiros vinte dias de vida, diminuindo a incidência de anaeróbios (MAGNE et al.; 2005).

Ainda que a colonização do trato gastrintestinal possa ser iniciada de diferentes formas e sob diversas influências, após em média 12-24 meses de vida, esta microbiota torna-se mais estável, quando o consumo de alimentos sólidos passa a substituir o leite e assemelha-se cada vez mais à composição da microbiota na fase adulta. Em adultos, a maioria das bactérias encontradas é pertencente a três filos: *Bacteroidetes* (gram-negativos), *Actinobacteria* e *Firmicutes* (gram-positivos) (ADLERBERTH; WOLD, 2009; MUSSO; GAMBINO; CASSEDER, 2011).

Dentre os gêneros agrupados nestes filos, os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* (*Bacteroidetes*) e *Clostridium* (*Firmicutes*) estão entre os mais populosos constituintes do ecossistema intestinal e merecem atenção por albergarem espécies que possuem diversidade bioquímica e potencial patogênico (produção de toxinas e enzimas proteolíticas, capacidade de invasão e elevada resistência aos antimicrobianos) (HOOPER; BRY; GORDON, 1998; MUSSO; GAMBINO; CASSEDER, 2011).

A relação entre obesidade e microbiota intestinal passou a ser discutida nos últimos 30 anos quando se observou redução de peso após cirurgia bariátrica acompanhada de alterações na microbiota intestinal (MUSSO; GAMBINO; CASSEDER; 2011). Atualmente a obesidade é considerada uma das principais doenças de saúde pública mundial por apresentar grande impacto sobre o corpo, com maiores modificações no metabolismo energético e nos mecanismos regulatórios, podendo levar ao diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, doenças gastrintestinais, incluindo doenças inflamatórias no intestino (CONTERNO et. al., 2011).

Alguns dos fatores que interferem na obesidade são: fatores genéticos, hábitos alimentares, idade, gasto energético e estilo de vida. A redução no gasto

energético da vida moderna e a predominância da dieta ocidental em países desenvolvidos e em desenvolvimento estão implicadas no aumento da obesidade no mundo (CONTERNO et al., 2011, WHO 2012).

Os carboidratos que não são digeridos pelo homem são fermentados pelas bactérias intestinais e têm como produtos finais ácidos graxos de cadeia curta (*short-chain fatty acids* – SCFAs). Estima-se que a produção de SCFAs no cólon corresponde a 10% da energia diária requerida pelo homem e que a sua absorção é, geralmente, realizada através de difusão passiva ou via transportadores de ácidos mono-carboxílicos (CONTERNO et. al., 2011, MUSSO; GAMBINO; CASSEDER, 2011).

Em estudo comparativo com humanos (30 eutróficos, 35 sobrepeso e 33 obesos) observou-se um aumento na concentração de SCFAs nas amostras fecais de indivíduos com sobrepeso e obesos, além do aumento da população de *Firmicutes* acompanhada da diminuição de *Bacteroidetes* (SCHWIERTZ et al., 2010).

Adicionalmente, em adolescentes obesos que receberam dieta menos calórica e que apresentaram perda de peso, a proporção de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foi contrária à observada com o ganho de peso, havendo aumento de *Bacteroidetes* e diminuição de *Firmicutes* (SANTACRUZ et al., 2009). Entretanto, até o momento nenhum trabalho demonstrou haver uma relação de causalidade entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento da obesidade.

Nas últimas décadas o Brasil vem sofrendo uma transição no estado nutricional de sua população, em que se observa um declínio da desnutrição e aumento da população com sobrepeso e obesa, independentemente da faixa etária e estratos sociais (IBGE, 2010).

Sabe-se que crianças com sobrepeso estão mais propensas, a se tornarem adultos com sobrepeso ou obesos (IBGE, 2010). Sendo assim, uma das formas mais eficientes de se prevenir à obesidade na idade adulta é através de intervenções durante a infância. Poucos são os estudos que reportam a situação nutricional das crianças brasileiras e sendo a obesidade uma doença de incidência mundial, de consequências futuras à saúde humana e de desenvolvimento não totalmente elucidado, este trabalho se justifica por investigar um dos possíveis aspectos envolvidos com a obesidade – a composição da microbiota intestinal.

## 2 OBJETIVOS

Analisar de forma comparativa alguns microrganismos que compõe a microbiota intestinal endógena de crianças eutróficas, com sobrepeso e obesas em idade escolar.

Para tanto, o presente estudo realizou:

1. Isolamento de espécies dos gêneros *Bacteroides*, *Parabacteroides* e *Clostridium*, de amostras fecais;
2. Verificação da presença de isolados enterotoxigênicos e dos padrões não-enteroxigênicos de *Bacteroides fragilis*; determinação dos toxinotipos e detecção dos genes *tpeL* e *netB* em isolados de *Clostridium perfringens*;
3. Avaliação quantitativa e comparativa da presença de: *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Parabacteroides distasonis*, *Bacteroidales*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium* Cluster I, *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. entre as crianças analisadas, por PCR em tempo real do gene 16S rRNA;
4. Avaliação da ocorrência de associação e/ou correlação entre a presença de tais microrganismos com as variáveis qualitativas: tipo de parto, aleitamento e uso de antibiótico nos primeiros seis meses de vida; e com as variáveis quantitativas: comprimento e peso ao nascer.

### 3 ANÁLISE DA LITERATURA

#### 3.1 Colonização do trato gastrointestinal

Na virada do século XX, o pediatra francês Henry Tissier afirmou que o desenvolvimento do feto humano ocorre em ambiente estéril e que o primeiro contato com microrganismos se dá durante o nascimento (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013). Mais de um século mais tarde, o conceito do “útero estéril” permaneceu um dogma, assim como o conceito de que qualquer microrganismo no útero é prejudicial para o feto. De fato, estudos a respeito do parto prematuro encontraram forte correlação entre infecções intra-uterinas e prematuridade (GOLDENBERG; HAULTH; ANDREWS, 2000; GONÇALVES; CHAIWORAPONGSA; ROMERO, 2002).

Considerando que nascimentos prematuros é a maior causa de natimortalidade, muitos esforços foram feitos para se identificar as bactérias responsáveis pelo parto prematuro. Muitas bactérias detectadas em infecções intra-uterinas são encontradas também na mucosa vaginal da mãe, como *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* e *Bacteroides* spp. (GOLDENBERG; HAULTH; ANDREWS, 2000), e o risco de parto prematuro aumenta em casos de gestantes com vaginose (GONÇALVES; CHAIWORAPONGSA; ROMERO, 2002).

Enquanto estudos sobre infecção intra-uterina e inflamação são pontos importantes para melhor compreensão das causas de partos prematuros, poucos são os trabalhos que examinaram o ambiente uterino saudável. Investigações sobre o potencial de invasão da placenta por bactérias provenientes de gestantes saudáveis observaram à presença de algumas espécies no sangue do cordão umbilical, no líquido amniótico e nas membranas fetais, tendo sido identificadas as espécies *E. faecium*, *S. epidermidis*, *P. acnes*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium* spp. (DiGIULIO et al., 2005; JIMENÉZ et al., 2005; SATOKARI et al., 2009).

Adicionalmente, no mecônio, primeira evacuação do recém nascido que corresponde ao material ingerido e/ou secretado durante a vida fetal (líquido amniótico, células epiteliais e muco), antes considerado estéril quando em uma gestação normal, foram observadas bactérias comensais como *Enterococcus* e *Leuconostoc* (GONSALBES et al., 2013; JIMENÉZ et al., 2008).

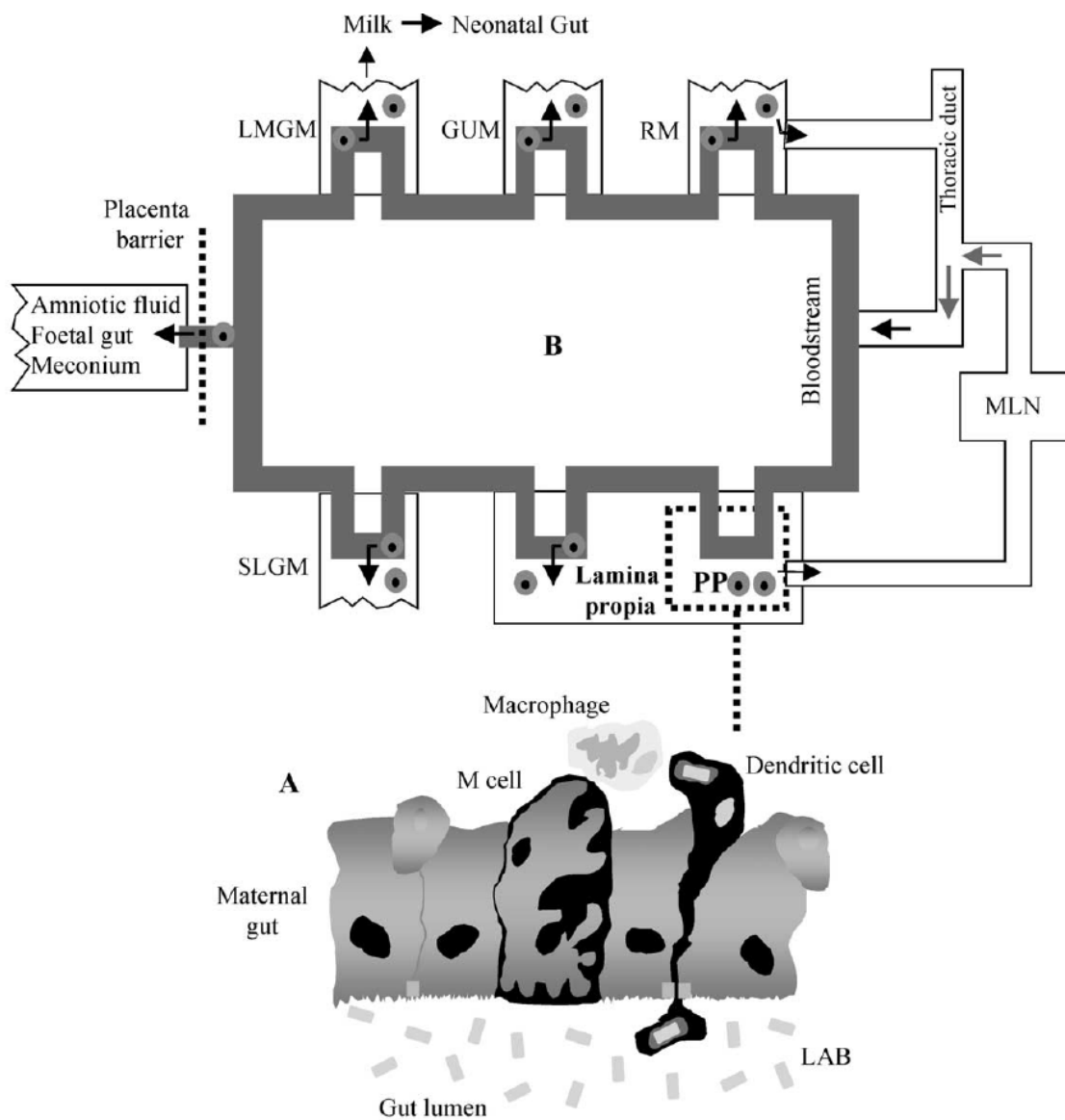
Entretanto, o mecanismo pelo quais as bactérias intestinais chegam à vida intra-uterina ainda não foi completamente elucidado. Uma possibilidade é a de que

as bactérias atravessam a placenta via corrente sanguínea após translocação pelo epitélio intestinal: enquanto o epitélio intestinal previne a penetração de microrganismos, células dendríticas presentes no tecido linfóide associado ao intestino (*Gut-associated lymphoid tissue* – GALT) e Placas Peyer conseguem emitir seus prolongamentos através das células epiteliais, capturar e transportar fragmentos e/ou células bacterianas vivas para os linfonodos, e por fim, atingem a corrente sanguínea (Figura 1) (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013).

Ainda hoje, pouco se sabe a respeito da concentração e heterogeneidade do inóculo bacteriano que atravessa a placenta, se ele persiste durante a infância ou se desencadeia efeitos à saúde da criança (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013). Contudo, sugere-se que algumas bactérias iniciam a colonização no intestino do feto como uma forma de adaptá-lo à vida fora do útero, já que bactérias do trato gastrointestinal são consideradas um forte estímulo para o desenvolvimento do GALT. Posteriormente, o processo continua durante e após o parto e com a amamentação (JIMENÉZ et al., 2008).

Diversos estudos demonstraram que a microbiota presente em todo o corpo humano (pele, oral, nasofaringe e intestinal) é influenciada pelo tipo de parto (ADLERBERTH; WOLD, 2009; DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010), sendo que aqueles nascidos de parto normal adquirem microrganismos comumente encontrados no canal vaginal e períneo da mãe, enquanto os nascidos de cesárea possuem microbiota mais semelhante à pele humana e ao ambiente hospitalar (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010).

**Figura 1** – Modelo hipotético de como as bactérias intestinais da mãe poderiam atravessar à placenta e chegar à glândula mamária.



Abreviaturas - LAB: bactérias ácido-láticas; GUM: mucosa do trato geniturinário; LMGM: mucosa da glândula mamária em lactação; MLN: linfonodo mesentérico; PP: Placas de Peyer e tecido linfóide associado; RM: mucosa do trato respiratório; SLGM: mucosa das glândulas salivar e lacrimal.

Fonte: Martín et al. (2004).



Horas após o nascimento o potencial de óxido-redução do intestino é positivo e, por isso, em crianças nascidas de parto normal a colonização é frequentemente iniciada por facultativos, sendo as espécies mais isoladas: *S. aureus* (4%), *S. epidermidis* (20%), *E. faecalis* (30%), *E. faecium* (10%), *E. coli* (20%), *K. aerogenes* (5%), *P. mirabilis* (2%), *Enterobacter cloacea* (1%) e *Serratia* spp. (1%). Após a colonização por facultativos ocorre o predomínio de anaeróbios como *Bifidobacterium* spp. com prevalência de *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis* e *B. breve*. A presença de *Clostridium* spp. (*C. paraputrificum*, *C. tertium*, *C. difficile*, *C. acetobutylicum* e *C. butyricum*) é demonstrada apenas dois dias após o nascimento, assim como *Bacteroides* spp. (*B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*) e *P. distasonis*. Outros anaeróbios frequentes são: *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella* e *Fusobacterium* (BEZIRTOGLOU, 1997).

Já em crianças nascidas de parto cesárea a microbiota é caracterizada por uma diminuição de anaeróbios devido a sua sensibilidade à exposição ao oxigênio, havendo predomínio de microaerófilos, facultativos e esporulados. A fonte de microrganismos passa a ser o ambiente hospitalar, veiculados por objetos e profissionais da saúde, o que justifica a menor diversidade de espécies nestes recém nascidos. A contaminação do ambiente é a razão da colonização precoce por *C. perfringens*, acompanhado da diminuição no número de *Bifidobacterium* spp. e *Bacteroides* spp. Tal padrão de colonização tem sido documentado em crianças com até 7 anos de idade (BEZIRTOGLOU, 1997; SAAVEDRA; DATTOLO, 2012).

A amamentação consiste em uma segunda via de transmissão de microrganismos. Em humanos, os microrganismos presentes no leite materno estão implicados no desenvolvimento do sistema imune, resistência contra infecção e prevenção contra o desenvolvimento de alergias e asma durante a infância (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013).

O leite materno é composto por proteínas, sendo a caseína a mais abundante, cálcio, fosfato e oligossacarídeos, além de conter espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BEZIRTOGLOU, 1997; FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013). Acredita-se que o baixo poder tamponante do leite e a presença de grandes quantidades de oligossacarídeos favorecem o crescimento de *Bifidobacterium* spp. que por sua vez

ao secretar ácido acético inibe a presença de *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp. (BEZIRTOGLOU, 1997).

Semelhante aos conhecimentos a respeito dos microrganismos que atravessam placenta, a origem das bactérias presentes no leite ainda não foi totalmente elucidada (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013). Durante a gestação a glândula mamária sofre diversas modificações que a preparam para a lactação, sendo a principal delas o aumento no número de ductos e alvéolos mamários.

Adicionalmente, ocorre aumento do fluxo de sangue e linfa para a glândula mamária que promove a contração das células mioepiteliais que envolvem as células alveolares da mama, havendo assim a extrusão do leite. Tais modificações criam condições adequadas para a formação de biofilme ao redor do mamilo, formado por espécies comumente encontradas na pele da mãe, como *Staphylococcus epidermidis*, ou formados por espécies predominantes na cavidade oral do bebê, *Streptococcus salivarius*, devido ao fluxo retrógrado do leite causado pela sucção do bebê (MARTÍN et al. 2004).

No entanto, *Bifidobacterium* spp. são as mais abundantes em número (KLAASSENS et al., 2009) e sendo espécies intestinais, sua origem é mais intrigante. Acredita-se haver uma via entero-mamária ocasionando sua translocação: sabe-se que durante a lactação a glândula mamária contém células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas, que são seletivamente recrutadas pelos hormônios lactogênicos e que poderiam transportar bactérias intestinais para dos ductos mamários (Figura 1) (MARTÍN et al., 2004).

Nos últimos 30 anos os leites de fórmulas vêm sendo modificados para se assemelharem cada vez mais ao leite materno, havendo adição de oligossacarídeos e *Bifidobacterium* spp. (ADLERBERTH; WOLD, 2009). Nas fezes de bebês amamentados por ambos os tipos de leite são encontrados as espécies *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* e *B. bifidum*, entretanto foi demonstrado que determinados genes são expressos apenas nas espécies providas pelo leite materno, por motivos não esclarecidos (KLAASSENS et al., 2009).

Além disso, aqueles que se alimentam com leite de fórmula apresentam alta contagem de *E. coli*, *C. difficile* e *Bacteroides* spp. não observada nos alimentados com leite materno (SAAVEDRA; DATTOLO, 2012), possivelmente porque o leite materno contém oligossacarídeos específicos que atuam como receptores para

bactérias, justificando também a maior diversidade de espécies em crianças alimentadas com leite de fórmula (HASCOET et al., 2011; MARTÍN et al., 2004).

Por fim, o último grande fator que influencia a colonização do intestino é o uso precoce de antibiótico. Comumente, recém-nascidos prematuros recebem antibióticos para prevenção de doenças infecciosas como pneumonia, que para um sistema imune imaturo pode ser fatal (MAGNE et al., 2005; SAAVEDRA; DATTILO, 2012). O uso de cefalosporinas e amoxicilinas nos primeiros dias de vida diminui o número de *Bifidobacterium* spp. e *Bacteroides* spp. e favorece o crescimento de *C. difficile* (SAAVEDRA; DATTILO, 2012). Ainda dentro dos primeiros seis meses após o nascimento, a hospitalização da criança seguida da administração de antibióticos diminui a diversidade microbiana e favorece a proliferação de *S. aureus*, *Klebsiella* spp. e enterobactérias (MAGNE et al., 2005).

### **3.2 Composição da microbiota intestinal humana**

#### *3.2.1 Crianças versus adultos*

Ainda que a colonização do intestino possa ser iniciada de diferentes formas e sobre diversas influências, após em média 12-24 meses de vida as grandes mudanças quanto à composição da microbiota já ocorreu, havendo pequenas modificações no decorrer do crescimento e desenvolvimento do indivíduo. O fator primordial destas modificações é o consumo de alimentos sólidos, que passa a substituir o leite e, com isso, aproxima cada vez mais à composição da microbiota infantil com a adulta (KOENING et al., 2011; SCOTT et al., 2011).

O intestino de um adulto saudável é colonizado por mais de 800 espécies bacterianas, com maior concentração no cólon (até  $10^{12}$  células/grama de fezes) (LAPARRA; SANZ, 2010). Tais bactérias podem ser divididas em cinco filos: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, sendo que os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* compreendem mais de 90% das bactérias totais (SHEN; OBIN; ZHAO, 2013).

Mariat et al. (2009) em um estudo comparativo da composição da microbiota entre adultos e crianças mostraram que as crianças apresentam menor contagem de células que os adultos e que em sua microbiota há predomínio de *Bifidobacterium* spp. Possivelmente isso se deve ao fato de que na infância são consumidos leite e

seus derivados em grandes quantidades e, muitos destes alimentos apresentam bactérias empregadas na sua fermentação como *Bifidobacterium* spp. e espécies de *Lactobacillus*, entre elas *L. paracasei*, *L. lactis* e *Leuconostoc* (BEZIRTZOGLU; STAVROPOULOU, 2010).

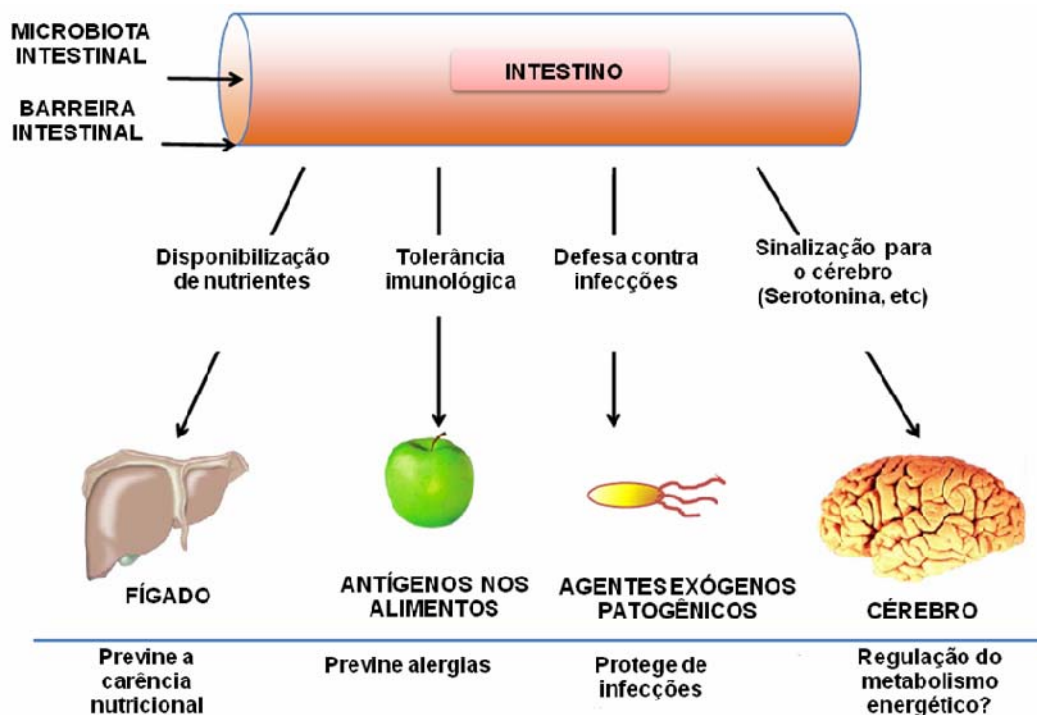
Dentre os *Bacteroidetes* as espécies *Bacteroides fragilis*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron* e *Parabacteroides distasonis* são dominantes em adultos e em crianças. Em relação os *Firmicutes* as espécies *C. perfringens* (Cluster I) e *C. difficile* (Cluster XI) são comumente encontradas em crianças enquanto adultos apresentam predomínio de espécies pertencentes aos clusters IV e XIV de *Clostridium* (ADLERBERTH; WOLD, 2009).

Além da introdução de alimentos sólidos, outro importante fator modulador das modificações da composição da microbiota intestinal é o antagonismo microbiano: a competição por receptores de adesão e por nutrientes, produção de substâncias antibacterianas, diferenças no potencial de oxido-redução e pH podem explicar o antagonismo entre os microrganismos do intestino, favorecendo o estabelecimento de uma ou outra espécie (BEZIRTZOGLU; STAVROPOULOU, 2011).

Recentemente, a exposição da criança aos microrganismos presentes no ambiente também tem sido avaliada: as boas condições de higiene impedem, muitas vezes, que a criança entre em contato com diversas espécies bacterianas e como consequência não ocorre à maturação adequada do sistema imune (Hipótese da higiene), o que pode predispor o indivíduo às alergias e possivelmente a outras doenças imunológicas (SANZ, 2011).

Em adultos e crianças a microbiota intestinal endógena estabelece complexas relações com seu hospedeiro ao impedir a invasão e proliferação de microrganismos exógenos patogênicos (HOOPER; BRY; GORDON, 1998), ao degradar polissacarídeos (fibras) não digeríveis pelo homem e sintetizar vitaminas (biotina, tiamina, vitamina B12 e vitamina K) (BAJZER; SEELEY, 2006) e ao promover a maturação e manutenção do sistema imune (BEZIRTZOGLU, STAVROPOULOU, 2011) (Figura 2).

**Figura 2** – Interações entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro.



Fonte: Adaptado de Bischoff (2011).

Nos últimos anos a relação entre o estado de saúde do hospedeiro e sua microbiota tem sido intensamente estudada (FUJIMIRA et al., 2010; SHEN; MARTIN; ZHAO, 2013) assim, conhecer sua composição torna-se um ponto chave para o entendimento de tais interações e seus possíveis efeitos.

### 3.2.2 *Bacteroidetes*

O filo *Bacteroidetes*, anteriormente denominado grupo *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB), está amplamente distribuído em diferentes habitats, desde lagos com alta concentração de sódio até em associação com o homem e outros animais. Baseado nos dados do gene 16S rRNA, este filo alberga três ordens: *Bacteroidales*, *Flavobacteriales* e *Sphingobacteriales* (GUPTA, 2004).

As bactérias da ordem *Bacteroidales* estão classificadas em cinco famílias: *Bacteroidaceae*, *Marinilabiliaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* e

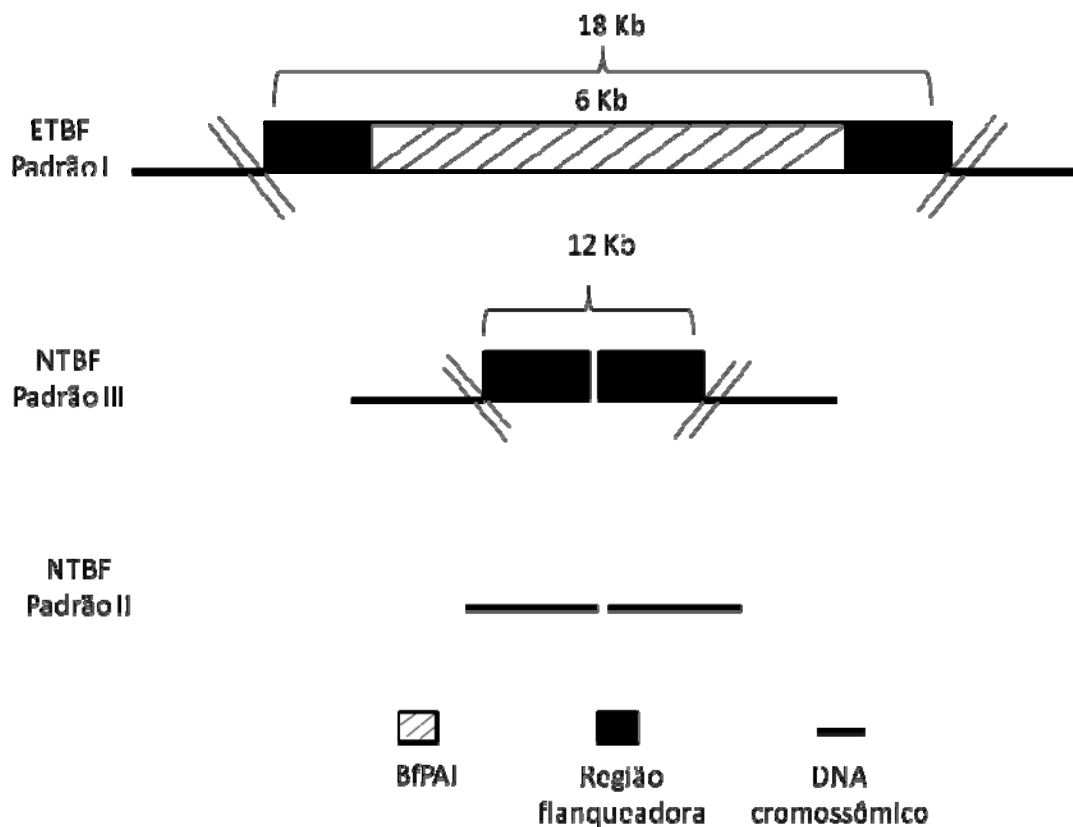
*Rikenellaceae*. Dentro desta ordem, e por sua vez dentro da família *Bacteroidaceae*, o gênero *Bacteroides* merece destaque por ser predominante no intestino. Compreende bacilos ou cocobacilos gram-negativos, anaeróbios estritos, resistentes à bile, imóveis, não formadores de esporos e sacarolíticos, encontrados na microbiota intestinal endógena não só de humanos, mas também de animais (CASTELLANI; CHALMERS, 1919).

Por muitos anos, as principais espécies de interesse médico deste gênero formavam o chamado “grupo *Bacteroides fragilis*”, sendo elas: *B. fragilis*, *B. eggerthii*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. caccae*, *B. stercoris* e *B. vulgatus*, *B. distasonis* e *B. merdae* (HOLDMAN et al., 1984). Entretanto, Sakamoto e Benno (2006) propuseram que duas espécies pertencentes ao “grupo” fossem reclassificadas em um novo gênero, por estarem filogeneticamente mais próximas dos organismos bile-sensíveis, tais como *Tannerella forsythia* (antigo *Bacteroides forsythensis*) e *Porphyromonas* spp. O novo gênero foi denominado *Parabacteroides* e inclui as seguintes espécies: *Parabacteroides distasonis* (antigo *B. distasonis*) e *Parabacteroides merdae* (antigo *B. merdae*).

Embora não seja a mais prevalente dentre as espécies de *Bacteroides*, *B. fragilis* é bastante estudada por apresentar uma variedade de fatores de virulência (colagenase, fibrinolisinase, heparinase, hialuronidase, lipase, neuraminidase, proteases, nucleases e sulfatases); e por ser a única espécie do gênero capaz de produzir enterotoxina, denominada fragilisina ou *Bacteroides fragilis toxin* (BFT), cuja ação está associada a quadros de diarreia em humanos e animais. Além disso, são aerotolerantes, pois podem sobreviver à exposição prolongada ao oxigênio sendo frequentemente isolada de infecções extra-intestinais (WEXLER, 2007).

A fragilisina é uma enterotoxina codificada pelo gene *bft* que está localizado em uma ilha de patogenicidade (*Bacteroides fragilis pathogenicity island* - BfPAI) de 6 Kb capaz de se mobilizar. A ilha é flanqueada por uma região de 12 Kb cujas análises da sequência de nucleotídeos revelaram que esta também possui capacidade de se mobilizar e que pode ocorrer de forma independente da ilha BfPAI. Assim, em função da presença da ilha de patogenicidade e de sua região flanqueadora, a espécie *B. fragilis* foi classificada em 3 padrões: padrão I (apresenta a ilha de 6 Kb e a região de 12 Kb), padrão II (não apresenta nenhum dos elementos genéticos) e padrão III (apresenta apenas a região de 12 Kb) (Figura 3) (FRANCO et al., 1999).

**Figura 3** - Cepas de *B. fragilis* baseado na presença da ilha BfPAI e sua região flanqueadora.



Abreviaturas: ETBF – *B. fragilis* enterotoxigênico; NTBF: *B. fragilis* não enterotoxigênico; BfPAI: ilha de patogenicidade. Fonte: Modificado de Franco et al. (2002).

A capacidade de síntese da enterotoxina depende da presença da ilha BfPAI e de sua região flanqueadora (somando uma região de 18 Kb), portanto, apenas as cepas de *B. fragilis* padrão I são consideradas enterotoxigênicas (ETBF). As cepas que apresentam os demais padrões são denominadas *B. fragilis* não-enterotoxigênicas (NTBF) (FRANCO et al., 2002) e são as cepas comumente encontradas no intestino (WICK; SEARS, 2010).

### 3.2.3 Firmicutes

O filo *Firmicutes* é constituído por bactérias com baixo conteúdo de G+C (<50%), morfologia, fisiologia e habitat extremamente variável. Seus integrantes estão divididos em três classes: *Clostridia*, *Bacilli* e *Mollicutes*, incluindo mais de 200 gêneros (LUDWIG; KLENK, 2001).

Representantes relevantes para a saúde humana estão organizados dentro do gênero *Clostridium*, que alberga aproximadamente 152 espécies, sendo a maioria comensais do intestino de humanos e animais (WIEGEL; TANNER; RAINEY; 2006). São bacilos, gram-positivos, anaeróbios estritos, formadores de esporos e por apresentarem elevada variabilidade genotípica estão organizados em 19 agrupamentos (clusters) (COLLINS et al. 1994; WIEGEL; TANNER; RAINEY; 2006).

Em crianças, as espécies pertencentes ao cluster I, seguido das pertencentes ao cluster XI são as mais dominantes, em que se destacam *C. perfringens* e *C. difficile*, respectivamente (ADLERBERTH; WOLD, 2009). *C. difficile* raramente coloniza o intestino de adultos saudáveis e quando o faz não atinge mais de  $10^4$  células/grama de fezes (ADLERBERTH; WOLD, 2009), podendo ser mais facilmente encontrado nas fezes de crianças com até um ano de idade, sem causar qualquer dano (ALLEN; EMERGY; LYERLY, 2003). Sua importância epidemiológica reside na participação em quadros de diarreias e colites associadas ao uso de antibióticos (McCLANE et al., 2006)

Embora *C. perfringens* seja constituinte primário da microbiota intestinal humana, este não corresponde ao microrganismo mais comumente isolado das fezes de adultos. Sua ampla distribuição é devido a seus esporos presentes no solo e em superfícies inanimadas frequentemente em contato com o homem. E por isso, podem participar de infecções polimicrobianas como, septicemia, mionecrose, peritonites, lesões obstrutivas, além de diarreias alimentares (ALLEN; EMERGY; LYERLY, 2003).

Isolados de *C. perfringens* são classificados em cinco toxinotipos (A, B, C, D e E) de acordo com a presença do gene *plc* codificador para a toxina alfa e sua combinação com os três genes para as outras toxinas principais: *cpb* (beta), *etx* (épsilon) e *iap* (iota) (Tabela 1). Além dessas quatro toxinas mencionadas, esta espécie ainda pode produzir mais de 15 toxinas em diversas combinações, como por exemplo, a enterotoxina (CPE) e a toxina beta-2 (CPB2) (UZAL; SONGER, 2008).



Os genes codificadores das toxinas podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídios, permitindo neste último caso, a transmissão horizontal de tais fatores de virulência (CARMAN et al., 2008).

**Tabela 1** - Classificação dos toxinotipos de *C. perfringens*.

Toxinotipos	Toxinas (genes)			
	Alfa ( <i>plc</i> )	Beta ( <i>cpb</i> )	Epsilon ( <i>etx</i> )	Iota ( <i>iap</i> )
A	x	∅	∅	∅
B	x	x	x	∅
C	x	x	∅	∅
D	x	∅	x	∅
E	x	∅	∅	x

Legenda: X – presença e ∅ – ausência do gene.

Fonte: Adaptado de Bokori-Brown et al. (2011).

Recentemente, duas novas toxinas foram descritas: TpeL (*Toxin Clostridium perfringens large cytotoxin*) (AMIMOTO et al., 2007) e NetB (*Necrotic Enteritis Toxin B-like*) (KEYBURN et al., 2008), ambas descobertas a partir de estudos sobre a participação de *C. perfringens* na etiologia da enterite necrótica em frangos.

Assim como a enterotoxina (CPE) a toxina TpeL é produzida durante a esporulação (PAREDES-SABJA; SARKER; SARKER, 2011), atuando sobre as proteínas da família Rho GTPases que regulam a polimerização da actina (CARON; HALL, 1998). Com isso, esta toxina ocasiona o alongamento e arredondamento de células epiteliais, com aumento da permeabilidade, tendo apresentado efeito citotóxico em células VERO (células de rim de macaco verde) (AMIMOTO et al., 2007).

A toxina NetB apresenta peso molecular semelhante ao da toxina Beta (33,2 kDa e 38,2 kDa, respectivamente) e embora suas sequências de aminoácidos sejam

apenas 38% homólogas, acredita-se que em função da presença de um resíduo conservado, elas compartilhem o mesmo mecanismo de ação: capacidade de formar poros nas membranas celulares (HUNTER et al., 1993; KEYBURN et al., 2008).

Até o presente momento, os genes *tpeL* e *netB* foram identificado apenas em isolados de *C. perfringens* obtidos de animais como frangos, cordeiros e bovinos, não havendo nenhum relato da presença destes genes em humanos.

### 3.3 Obesidade

A obesidade pode ser definida como uma patologia em que o excesso de gordura estocada pode comprometer negativamente a vida do indivíduo (KOLPMAN et al., 2000; WHO 2012). Caracteriza-se por não ser uma desordem isolada (KOLPMAN et al., 2000), podendo causar ou exacerbar diversos problemas de saúde, de maneira independente ou em associação com outras doenças. Em particular, está associada ao desenvolvimento do diabetes tipo 2, doenças coronarianas, aumento no risco de certos tipos de câncer, apnéia, artrites e infecções nosocomiais, pós-cirúrgicas e gastrintestinais (FALAGAS; KOLPMAN et al., 2000; KOMPOTI, 2006; KOPLAN et al., 1999; RIEB et al., 2003;).

Sabe-se que a ingestão de energia superior à quantidade gasta leva ao armazenamento na forma de gordura, havendo aumento do número e tamanho dos adipócitos que, conseqüentemente, ocasionam aumento do peso (KOPLAN et al., 1999; SHERMAN, 2013). O controle do peso é determinado pela interação entre fatores genéticos, ambientais e psicossociais que atuam através de mediadores fisiológicos do controle da ingestão e gasto de energia (KOLPMAN et al., 2000).

Em adultos (indivíduos acima de 20 anos) o acúmulo de gordura pode ser determinado pelo Índice da Massa Corporal (IMC) que se traduz na fórmula matemática:

$$\text{IMC} = \frac{P}{A^2}$$

Em que P é o peso em quilogramas (Kg) e A é a altura em metros (m). Com base no IMC os indivíduos são classificados com déficit de peso ( $\text{IMC} < 18,5$ ), peso ideal ( $18,5 \leq \text{IMC} \leq 24,9$ ), sobrepeso ( $\text{IMC} \geq 25$ ) e obeso ( $\text{IMC} \geq 30$ ) (WHO, 1995). A

partir da década de 1970, a epidemia da obesidade começou a emergir nos EUA, coincidindo com o período em que mais estabelecimentos de alimentos “*fast-food*” surgiram (KANT; GRAUBARD, 2004). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 10% dos homens e 14% das mulheres mundialmente são obesos (WHO, 2012), possivelmente devido ao aumento no consumo de alimentos ricos em calorias acompanhadas do estilo de vida sedentárias (KAIN et al., 2002; SHERMAN, 2013).

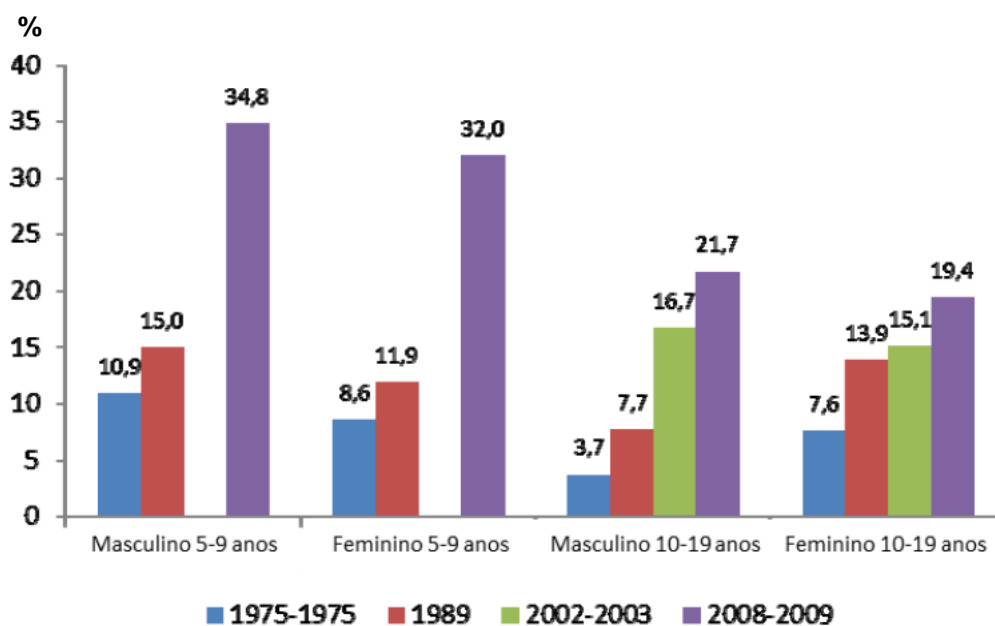
As mudanças na prevalência da obesidade em adultos são refletidas pelo aumento de peso em crianças e adolescentes, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O aumento excessivo de peso ainda na infância aumenta o risco de obesidade na fase adulta, juntamente com suas comorbidades já mencionadas (KOLPMAN et al., 2000). No entanto, diferentemente do que acontece com adultos, o IMC na infância muda substancialmente com a idade: Em uma criança saudável o IMC ao nascer é de 13 Kg/m<sup>2</sup>, passando para 17 Kg/m<sup>2</sup> aos 24 meses, caindo para 15,5 Kg/m<sup>2</sup> aos 6 anos e aumentando para 21 Kg/m<sup>2</sup> aos 20 anos. Claramente, é possível notar que um ponto de corte referente à idade é necessário para determinar a obesidade na infância (COLE, 2000).

Acredita-se que o uso do IMC para identificar o excesso de peso em crianças e adolescentes tem a vantagem de ser um índice empregado na fase adulta. Com base nessas premissas, a OMS elaborou em 2006 um referencial para crianças de 0 a 5 anos de idade e subsequentemente em 2007, um referencial para aqueles entre 5 e 19 anos, considerando a idade e o sexo do indivíduo para estabelecimento dos pontos de corte. Os dados para elaboração dos referenciais foram obtidos com base em uma amostragem de diferentes origens étnicas proveniente de seis países (entre eles o Brasil) permitindo, assim, comparações entre diversos grupos populacionais (WHO, 2006; ONIS et al., 2007).

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada no período de 2008-2009, o número de adultos brasileiros com excesso de peso (indivíduos com sobrepeso e obesos) aumentou 1 ponto percentual a cada ano desde a POF 2002-2003, indicando que atualmente aproximadamente 50% da população brasileira apresenta excesso de peso. Estima-se que em cerca de dez anos dois terços dos adultos no Brasil apresentarão excesso de peso, prevalência idêntica à encontrada nos Estados Unidos (IBGE, 2010).

Não obstante, os dados obtidos pela POF 2008-2009 revelou que crianças entre 5 e 9 anos de idade e entre adolescentes, a prevalência do excesso de peso, que apresentava aumento modesto até o final da década de 1980, triplicou nos últimos 20 anos e hoje atinge entre um quinto a um terço dos jovens (Figura 5). A pesquisa também mostrou que a prevalência é semelhante entre meninos e meninas (34,8% e 32%, respectivamente) e concentram-se em ambos os sexos entre crianças e adolescentes que vivem em áreas urbanas (IBGE, 2010).

**Figura 4** – Evolução da prevalência de excesso de peso em crianças e adolescentes no Brasil.



Fonte: POF 2008-2009 (IBGE, 2010).

### 3.4 Obesidade e microbiota intestinal endógena

A relação entre obesidade e microbiota intestinal passou a ser discutida nos últimos 30 anos quando se observou a redução de peso após cirurgia bariátrica e em casos de ganho de peso após a lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial, que está associado com a regulação da ecologia da microbiota intestinal (MUSSO; GAMBINO; CASSEDER, 2011). Com base em estudos realizados com camundongos livres de germes, dados recentes demonstram haver uma correlação entre a composição da microbiota, a homeostase energética, o acúmulo de gordura e a obesidade (CONTERNO et al., 2011). Backhed et al. (2004) mostraram que o transplante de microbiota de um animal convencional (com microbiota residente) para um animal livre de germes (C57BL/6) conduz a um aumento de 60% de gordura corpórea e resistência à insulina após 14 dias de dieta diminuída.

Também, Turnbaugh et al. (2006) demonstraram que animais desprovidos de microrganismos posteriormente colonizados com microbiota proveniente de animais obesos apresentam um aumento de peso em relação àqueles colonizados por microbiota de animais magros; foi demonstrado haver um aumento na proporção de *Firmicutes* em relação ao inóculo do animal magro e que após duas semanas, a composição da microbiota do animal que foi colonizado era semelhante à do doador.

Sabe-se que os mamíferos conseguem absorver monossacarídeos simples como glicose e galactose; podem hidrolisar dissacarídeos, como lactose e maltose, em seus respectivos monossacarídeos; e conseguem degradar amido, mas apresentam uma capacidade limitada de degradar outros polissacarídeos. Entretanto, os microrganismos desenvolveram a habilidade de degradar diversos conjugados glicosilados derivados de plantas e de seus hospedeiros, como celulose, ácido hialurônico, mucina e heparina, e tal habilidade tornou-se uma importante vantagem na competição no ecossistema intestinal (MUSSO; GAMBINO; CASSEDER, 2011).

Os carboidratos que não são digeridos pelo homem são fermentados pelas bactérias intestinais e têm como produtos finais ácidos graxos de cadeia curta (*short-chain fatty acids* – SCFAs), especificamente acetato, propionato e butirato. Estima-se que a produção de SCFAs no cólon a partir da fermentação corresponde a 10% da energia diária requerida pelo homem e que a sua absorção é, geralmente, realizada através de difusão passiva ou via transportadores de ácidos mono-

carboxílicos. Acetato, butirato e propionato são absorvidos por diferentes tecidos, como as células epiteliais do cólon, hepatócitos e adipócitos, e possuem diferentes destinos metabólicos (CONTERNO et al., 2011, MUSSO; GAMBINO; CASSEDER, 2011).

Animais deficientes em leptina (ob/ob), o hormônio regulador da saciedade, são modelo de obesidade genética e apresentam aumento na concentração de SCFAs nas fezes, quando comparados com animais não-obesos (CONTERNO et al., 2011). Semelhantemente, em estudo comparativo com humanos (30 eutróficos, 35 sobrepeso e 33 obesos) observou-se um aumento na concentração de SCFAs nas amostras fecais de indivíduos com sobrepeso e obesos, além do aumento da população de *Firmicutes* acompanhada da diminuição de *Bacteroidetes* (SCHWIERTZ et al., 2010).

Em adolescentes com idade de aproximadamente 15 anos, os *Firmicutes*: *C. histolyticum*, *C. lituseburensense*, *C. coccoides* (cluster XIVa) diminuíram, enquanto *Bacteroides* e *Prevotella* aumentaram após uma perda de peso de mais de 4 Kg (NADAL et al., 2009). Em outro estudo, adolescentes obesos que receberam dieta menos calórica e que apresentaram perda de peso, possuíam microbiota intestinal endógena distinta daqueles que não apresentaram perda de peso eficiente (SANTACRUZ et al., 2009). Entretanto, até o momento nenhum trabalho demonstrou haver uma relação de causalidade entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento da obesidade.

Em um estudo longitudinal realizado com gestantes e crianças de até 7 anos de idade, Ajslev et al. (2011) verificaram que o risco de obesidade infantil depende fortemente do aumento de peso da mãe durante a gravidez e que o uso de antibióticos nos primeiros meses de vida aumenta o risco de obesidade em crianças cujas mães apresentavam um peso normal durante a gestação.

Outro trabalho mostrou que gestantes obesas ou que apresentaram ganho de peso durante a gestação superior a 16 Kg possuíam maior quantidade de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Staphylococcus* (COLLADO et al., 2008) sendo tal alteração da microbiota também observada nas crianças com excesso de peso na faixa de 7 anos de idade (KALLIOMAKI et al., 2008). Adicionalmente, Kalliomaki et al. (2008) buscando investigar as diferenças na diversidade microbiana entre crianças obesas e/ou com sobrepeso e eutróficas na faixa de 7 anos de idade, reportou que 40% das crianças acima do peso receberam antibióticos nos primeiros

meses de vida contra 13% das crianças eutróficas, sugerindo que alterações sobre a composição da microbiota poderiam estar associada ao ganho de peso na infância.

Como já mencionado a obesidade é uma doença crônica que em longo prazo conduz a quadros de hipertensão, dislipidemias, diabetes, entre outras doenças que comprometem o bem estar e a saúde do indivíduo (KOLPMAN et al., 2000; KOPLAN et al., 1999; RIEB et al., 2003). Nas últimas décadas o Brasil vem sofrendo uma transição no estado nutricional de sua população, em que se observa um declínio da desnutrição e aumento da população obesa e com sobrepeso (IBGE, 2010). Sabe-se que crianças com sobrepeso estão mais propensas, a se tornarem adultas com sobrepeso ou obesas (COLIN, 2000; IBGE, 2010). Sendo assim, uma das formas mais eficientes de se prevenir à obesidade na idade adulta é através de intervenções durante a infância.

Um estudo realizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, revelou que crianças entre 4 e 11 anos de idade apresentaram um aumento de peso relacionado com o parto cesárea (BARROS et al., 2012). Em Salvador, Bahia, foi visto que o aumento gradativo do risco para sobrepeso/obesidade em crianças entre 0 e 5 anos de idade está relacionado com o aumento da idade, mesmo sendo consideradas crianças de baixa renda (MATOS et al., 2012).

Desta forma, além da ingestão de calorias excessivas e o estilo de vida sedentário, outras variáveis parecem estar relacionadas com o aumento de peso, pelo menos na infância e, portanto, devem ser investigadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Grupos estudados

Foram coletadas 84 amostras fecais de crianças não diarreicas com idade de 3 a 11 anos, sendo: 30 de crianças eutróficas, 24 com sobrepeso e 30 obesas, sem distinção de sexo e raça. Como critérios de exclusão não foram coletados amostras de crianças que estavam sob tratamento com antimicrobianos ou que estiveram em tratamento nos últimos três meses, e de meninas que já haviam tido a primeira menarca. As amostras foram coletadas no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas (Faculdade de Medicina da USP) e em escolas públicas e privadas (EE Clorinda Dante, Creche Maria de Nazaré e Colégio Trentus) da região metropolitana de São Paulo.

As crianças foram classificadas em cada grupo com base no escore Z de acordo com o Quadro 1, presente no documento “Diagnóstico da obesidade infantil” da Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) (MELO, 2011), elaborado com base nas curvas de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2006 e 2007 (ONIS et al. 2007; WHO, 2006). As medidas de altura e peso, para a idade e sexo, de cada criança foram avaliadas no programa WHO Anthro Plus (OMS) que fornece o escore Z empregado para classificar as crianças.

**Quadro 1.** Tabela de escore Z empregado na classificação das crianças.

Valor encontrado na criança		Diagnóstico nutricional
< Percentil 0,1	< Escore z -3	Magreza acentuada
≥ Percentil 0,1 e < Percentil 3	≥ Escore z -3 e < Escore -2	Magreza
≥ Percentil 3 e < Percentil 85	≥ Escore z -2 e < Escore +1	Eutrofia
≥ Percentil 85 e < Percentil 97	≥ Escore z +1 e < Escore +2	Sobrepeso
≥ Percentil 97 e ≤ Percentil 99,9	≥ Escore z +2 e ≤ Escore +3	Obesidade
> Percentil 99,9	> Escore z +3	Obesidade grave

Fonte: Melo, 2011

Adicionalmente à coleta do material fecal os familiares responsáveis pelas respectivas crianças assinaram o Termo de Livre e Esclarecimento devidamente



aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Proc. N° 1043/CEP) e responderam um questionário cujos dados fazem parte da análise deste estudo (Anexo 1).

#### **4.2 Coleta dos espécimes clínicos e isolamento bacteriano**

As amostras fecais evacuadas naturalmente foram coletadas em potes coletores universais estéreis e em meio de transporte Carry Blair e levadas imediatamente para o laboratório. As fezes transferidas para o meio de transporte Carry Blair foram semeadas em meio seletivo *Clostridium* acrescido de sangue de carneiro, para isolamento de *Clostridium* spp., e em meio seletivo ágar *Bacteroides fragilis* bile-esculina (BBE), para isolamento de espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides*. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose (90% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>), a 37 °C, por cinco dias.

Após o período de incubação foi observada a morfologia colonial característica para cada microrganismo, sendo as colônias características transferidas para placa de ágar sangue suplementado com hemina (5 µg/mL) e menadiona (1 µg/mL) e incubadas em condições de anaerobiose, a 37 °C, por 5 dias, para isolamento de cultura pura. Paralelamente, uma colônia de cada isolado foi semeada em placa de ágar sangue incubado em atmosfera de aerobiose, por 24 horas, para teste respiratório.

#### **4.3 Identificação bacteriana**

A identificação definitiva para determinação de espécie foi realizada pelo kit de identificação API 20A (BioMérieux, Brasil) para os possíveis isolados do gênero *Clostridium* e por PCR Multiplex para os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* (Liu et al., 2003). Após isolamento e identificação as cepas foram mantidas em ágar sangue e congeladas em Cryo Care (Key Scientific Products, Inc., EUA) e mantidas a -80 °C.

## 4.4 Extração de DNA

### 4.4.1 Extração de DNA cromossômico

Foi realizado extração de DNA cromossômico das culturas puras pelo kit comercial QIAamp DNA Mini Kit, (QIAGEN, Brasil), segundo as instruções do fabricante, para avaliação das cepas enterotoxigênicas de *B. fragilis*.

E para as cepas de *C. perfringens* os DNA bacterianos foram extraídos segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) pelo método tradicional fenol-clorofórmio. Uma colônia de cada cepa foi crescida em 5 mL de BHI em anaerobiose por 48 h. O sedimento bacteriano lavado duas vezes em PBS (pH 7,2), foi incubado com 70 µL de lisozima (10 mg/mL) a 37 °C por 4 h. Em seguida, foram adicionados 35 µL de sódio duodecil sulfato (SDS 20%) e 70 µL de proteinase K (20 mg/mL), e incubados a 55 °C por 2 h, sendo posteriormente, adicionados volumes iguais de fenol:clorofórmio (1:1) e centrifugados (14.000 g x 6 min). O sobrenadante (DNA) foi precipitado com volumes iguais de acetato de sódio (20%) e isopropanol absoluto. Em seguida, o DNA foi lavado com etanol gelado (70%) e centrifugado (14.000 g x 10 min), e o mesmo, eluído em 100 µL de água ultra pura, sendo estocado a -30 °C, até seu uso.

Todos os DNA foram avaliados quanto à concentração e integridade, por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA), visualização em gel de agarose (1%) e mantidos a -30 °C, até seu uso.

### 4.4.2 Extração de DNA total das fezes

DNA total das fezes estocados a -80 °C foi extraído utilizando kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Brasil) conforme instruções do fabricante, para a quantificação de *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *P. distasonis*, *P. merdae*, *Bacteroidales*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *Clostridium* Cluster I, *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Todos os DNA foram eluídos em solução tampão fornecida pelo kit, sendo esta com baixa concentração de sal, livre de proteínas, nucleases e impurezas inibitórias da reação de PCR. Após a extração, os DNA foram avaliados quanto à concentração e integridade, por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e mantidos a -30 °C, até seu uso.

#### 4.5 Avaliação das cepas de *B. fragilis* enterotoxigênicas

##### 4.5.1 Detecção por PCR do gene *bft* em isolados *B. fragilis* (PANTOSTI et al., 1994).

As reações de amplificação foram realizadas para detectar a presença do gene *bft* que codifica a produção da toxina fragilisina. A amplificação do DNA foi realizada em reação com volume final de 25 µL, contendo: 2,5 µL de 10X de tampão PCR, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,0 µL de dNTP (20 µM), 0,25 µL de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) (0,5 U), 1,0 µL de cada iniciador (20 µM) (Tabela 2), 17 µL de água ultra-pura esterilizada e 1 µL de DNA (10 ng). A amplificação foi realizada em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400 programado para 1 ciclo de 94 °C (5 min), 35 ciclos de 94 °C (1 min), 52 °C (1 min) e 72 °C (1 min); e 1 ciclo de 72 °C (5 min) para extensão final.

Foi utilizada como controle positivo a cepa enterotoxigênicas *B. fragilis* GAI 97124 e como controle negativo a cepa *B. fragilis* ATCC 25285 (não enterotoxigênico). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%). O controle de peso molecular foi o marcador de 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sobre transluminador UV com câmera Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120)

##### 4.5.2 Detecção por PCR dos padrões não-enterotoxigênico de *B. fragilis* isolados (FRANCO et al., 1999).

A amplificação do DNA foi realizada em reação com volume final de 25 µL, contendo: 2,5 µL de 10X de tampão PCR, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,0 µL de dNTP (20 µM), 0,25 µL de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) (0,5 U), 1,0 µL de cada iniciador (20 µM) (Tabela 2), 17 µL de água ultra-pura esterilizada e 1 µL de DNA (10 ng). A amplificação foi realizada em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400 programado para 1 ciclo 94 °C (5 min), seguido por 30 ciclos de 94 °C (1 min), 66 °C (2 min), 72 °C (1 min), e 1 ciclo de 72 °C (5 min) para extensão final.

Foi utilizada como controle positivo a cepa não-enterotoxigênica *B. fragilis* ATCC 25285 (padrão II) e como controle negativo a cepa enterotoxigênica *B. fragilis*

GAI 97124 (padrão I). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como descritos anteriormente.

**Tabela 2.** Sequências oligonucleotídicas para detecção de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico e não-enterotoxigênico.

Genes	Oligonucleotídeos	Produto (bp)
	5' → 3'	
<i>bft</i> (Padrão I)	F: GAC GGT ATG TGA TTTG TCT GAG AGA	294
	R: ATC CCT AAG ATT TTA TCC CAA GTA	
Padrões NTBF	F: TTC AAC CTG ATC GAT CCG GAA GAT CCG	1.600 (Padrão III)
	R: GCT GGT AGA CTA CCT GAG TAA GGA GTC	Ausência (Padrão II)

Legenda: *bft* – gene fragilisina; NTBF: *B. fragilis* não-enterotoxigênico.

#### 4.6 Avaliação das cepas de *C. perfringens* toxigênicas

##### 4.6.1 Determinação dos toxinotipos de isolados *C. perfringens* por PCR Multiplex (BAUMS et al., 2004).

As reações de amplificação foram realizadas para detectar a presença dos genes *plc*, *cpb*, *cpe*, *etx* e *iap* que mediam a produção das toxinas alfa (CPA), beta (CPB), épsilon (ETX) e iota (ITX), empregadas para determinação dos toxinotipo de *C. perfringens*. Adicionalmente, também foram detectadas a presença dos genes *cpb2* e *cpe* que sintetizam a toxina beta-2 e a enterotoxina CPE, respectivamente.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de 10X de tampão PCR, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,0 µl de dNTP (20 µM), 0,25 µL de Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen, Brasil), 1,0 µL de cada iniciador (20 µM) (Tabela 3), 6,75 µL de água ultra-pura esterilizada e 1,0 µL de DNA bacteriano (10 ng). O termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400 foi programado para: 1 ciclo de 95 °C (3 min), 35 ciclos de 95 °C (1 min), 56 °C

(1 min) e 72 °C (1 min); e 1 ciclo de 72 °C (5 min) para extensão final. *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (toxintipo A) e amostras de DNA de cada toxintipo de *C. perfringens*: CpB (toxintipo B), CpD (toxintipo D) e CpE (toxintipo E), foram utilizadas como controles positivos, como controle negativos foi utilizado o DNA de *Clostridium sporogenes* 2413 e água ultra pura esterilizada. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como descritos anteriormente.

#### 4.6.2 Detecção por PCR do gene *tpeL* em isolados *C. perfringens* (AMIMOTO et al., 2007).

As reações de amplificação foram realizadas para detectar a presença do gene *tpeL* que codifica a toxina TpeL. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de 10X de tampão PCR, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,0 µl de dNTP (20 µM), 0,25 µL de Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen, Brasil), 1,0 µL de cada iniciador (20 µM) (Tabela 3), 17 µL de água ultra-pura esterilizada e 1,0 µL (1:10) de DNA. O termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) foi programado para: 1 ciclo de 94 °C (2 min), 35 ciclos de 94 °C (30 s), 55 °C (1 min) e 72 °C (1 min); e 1 ciclo de 72 °C (5 min) para extensão final. DNA da cepa *C. perfringens* JGS-5369, foi utilizado como controle positivo. Como controles negativos foram usados os DNA de *Clostridium difficile* VPI 10468 e *Clostridium sporogenes* 2413 e água ultra pura esterilizada. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como descritos anteriormente.

**Tabela 3.** Sequências de oligonucleotídeos para detecção dos genes produtores de toxinas em *C. perfringens*.

Genes	Toxina	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Produto (bp)
<i>plc</i>	Alfa	F: AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA R: TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC	900
<i>cpb</i>	Beta	F: TCC TTT CTT GAG GGG AGG ATA AA R: TGA ACC TCC TAT TTT GTA TCC C	611
<i>cpe</i>	Enterotoxina	F: GGG GAA CCC TCA GTA GTT TCA R: ACC AGC TGG ATT TGA GTT TAA TG	506
<i>etx</i>	Épsilon	F: TGG GAA CTT CGA TAC AAG CA R: TTA ACT CAT CTC CCA TAA CTG CAC	393
<i>iap</i>	lota	F: AAA CGC ATT AAA GCT CAC ACC R: CTG CAT AAC CTG GAA TGG CT	296
<i>cpb2</i>	Beta 2	F: CAA GCA ATT GGG GGA GTT TA R: GCA GAAT CAG GAT TTT GAC CA	200
<i>tpel</i>	TpeL	F: ATA TAG AGG CAA GCA GTG GAG R: GGA ATA CCA CTT GAT ATA CCT G	466
<i>netB</i>	NetB	F: GCT GGT GCT GGA ATA AAT GC R: TCG CCA TTG AGT AGT TTC CC	384

#### 4.6.3 Detecção por PCR do gene *netB* em isolados *C. perfringens* (KEYBURN et al., 2008).

A detecção do gene *netB*, que codifica a toxina NetB, foi realizada em reações amplificação em volume final de 25 µl contendo: contendo 2,5 µL de 10x de tampão PCR, 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,0 µl de dNTP (20 µM), 0,25 µL de

Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen, Brasil), 1,0 µL de cada iniciador (20 µM) (Tabela 3), 16,25 µL de água ultra-pura e 2 µL (1:10) de DNA. O termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) foi programado para: 1 ciclo de 95 °C (3 min), 35 ciclos de 95 °C (1 min), 60 °C (1 min) e 72 °C (2 min); e 1 ciclo de 72 °C (5 min) para extensão final. DNA da cepa *C. perfringens* EHE-NE-18 (*netB*<sup>+</sup>), foi usado como controle positivo. Como controles negativos foram usados os DNA de *Clostridium difficile* VPI 10468 e *Clostridium sporogenes* 2413 e água ultra pura esterilizada. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como descritos anteriormente.

#### 4.6.4 Sequenciamento dos genes *tpeL* e *netB*.

Os DNA bacterianos positivos para os genes *tpeL* e *netB* foram submetidos a reação de sequenciamento, com os iniciadores utilizados na detecção de cada gene (Tabela 3). Os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial Illustra GFX (GE Healthcare Life Sciences do Brasil), e as reações foram realizadas segundo o sistema MEGABACE 1000, utilizando DYENAMIC ET Dye Terminator kit (Thermo Sequenase II DNA polimerase), e enviadas para sequenciamento (Projeto Genoma Humano, Serviço de Sequenciamento, IB-USP). As sequências obtidas foram analisadas pelos programas Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd.) e comparadas com as sequências depositadas no GenBank, com o auxílio do programa BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)).

#### 4.6.5 Detecção do efeito citotóxico em células VERO (AMIMOTO et al., 2007).

A citotoxicidade foi realizada em células Vero utilizando-se os sobrenadantes dos *C. perfringens* *plc*<sup>+</sup>/*tpeL*<sup>-</sup> e *plc*<sup>+</sup>/*tpeL*<sup>+</sup>, para estudo da toxina TpeL, e os sobrenadantes dos isolados *C. perfringens* *plc*<sup>+</sup>/*netB*<sup>-</sup> e *plc*<sup>+</sup>/*netB*<sup>+</sup>, para estudo da toxina NetB. As células epiteliais foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) (Vitrocell Embriolife, SP, Brasil), suplementado com 2% (v/v) de soro fetal bovino. Em seguida, 1 mL da suspensão celular (1 x 10<sup>5</sup> células/mL), foi adicionado em microplacas de 24 poços e incubado a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h.

Posteriormente, 0,5 mL de sobrenadante bacteriano foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada nas condições anteriormente descritas. As células foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100, Japão) durante três dias (24, 48 e 72 horas de incubação) e fotografadas com câmera digital (Sony, CyberShot). O sobrenadante de *C. perfringens* ATCC 13124 *plc*<sup>+</sup>/*tpaL*<sup>-</sup> foi usado como controle positivo de citotoxicidade e caldo BHI esterilizado como controle negativo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes independentes. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dra. Roxane M. F. Piazza.

#### 4.7 Análises quantitativas das amostras fecais: PCR quantitativo (SybrGreen)

Foram avaliadas quantitativamente as seguintes espécies: *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *P. distasonis*, *C. perfringens*, *C. difficile* e os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Para uma avaliação mais ampla das principais espécies de *Clostridium* isoladas em cultivo, oligonucleotídeos para Cluster I foi empregado. Da mesma forma, um par de oligonucleotídeos foi confeccionado para estudo das principais espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides* (*Bacteroidales*) e para isso a quantificação do valor global foi em relação à somatória dos valores obtidos de *Bacteroides* spp. e *P. merdae*.

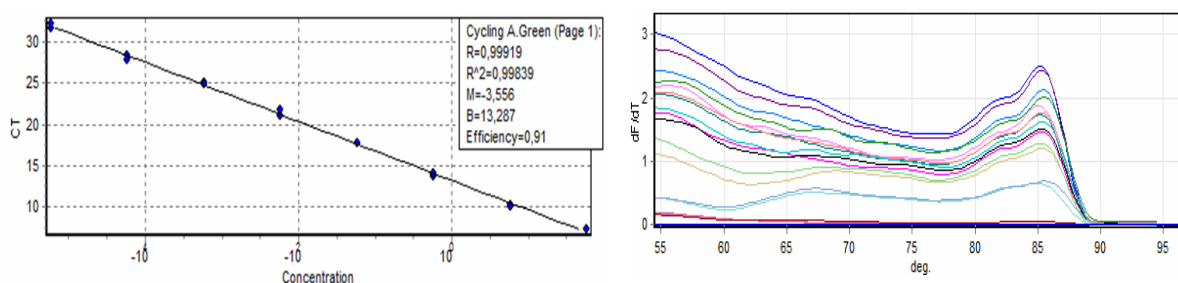
A padronização de cada curva padrão foi realizada com oito pontos de diluições seriada, em duplicata, do DNA cromossômico das seguintes cepas de referência: *B. fragilis* ATCC 25285, *B. vulgatus* ATCC 8482, *P. distasonis* ATCC 8503, *P. merdae* ATCC 43184, *C. perfringens* ATCC 13124, *C. difficile* VPI 10468 *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1696 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Para as curvas Cluster I e *Bacteroides* spp. foram empregadas, respectivamente, as cepas *C. perfringens* ATCC 13124 e *B. fragilis* ATCC 25285. Pela análise do programa, foram consideradas as curvas que apresentaram eficiência entre 0,9 – 1,0 (Figuras 5 a 14).

As reações de amplificação foram realizadas em duplicata, com volume final de 20 µL contendo 10 µL do SYBR Green PCR Master Mix 2X (contem *Taq* DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix e SYBR dye (GoTaq qPCR Master Mix/Promega Corporation, Brasil) 0,9 µL da solução de cada par de primer (5 µM)

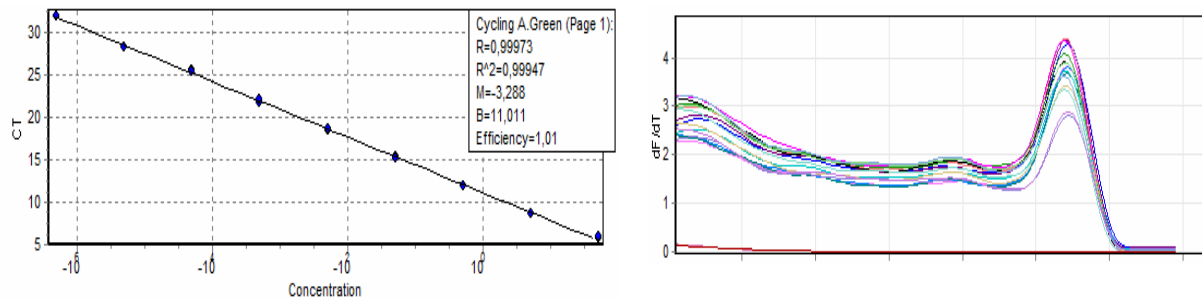


(Tabela 4), 2  $\mu\text{L}$  de DNA e 7,1  $\mu\text{L}$  de água ultra pura (Promega, Brasil). As amplificações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mort lake, New South Wales, Australia). As condições para amplificação foram: 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos (Tabela 4) por 30 segundos. Após a ciclagem, a curva de dissociação foi realizada para avaliar a presença de *primers dimers*. Como controle negativo foi utilizado uma mistura da reação sem DNA. A identificação do sinal fluorescente foi realizada nos 30 segundos finais da etapa de extensão.

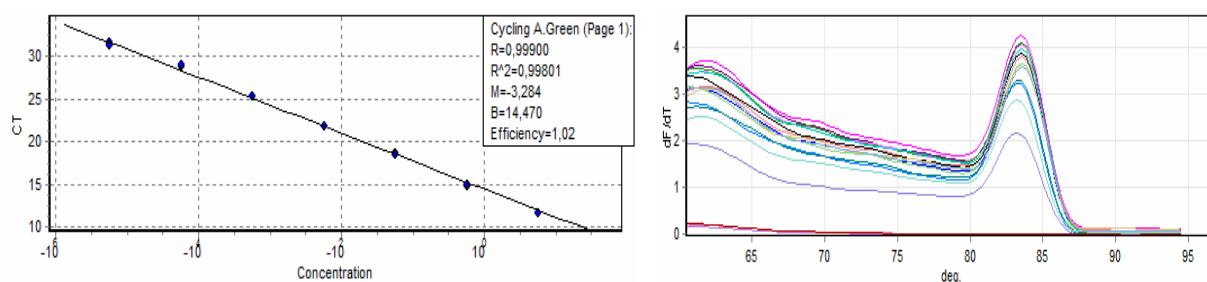
**Figura 5 – Curva padrão *B. fragilis* ATCC 25285.**



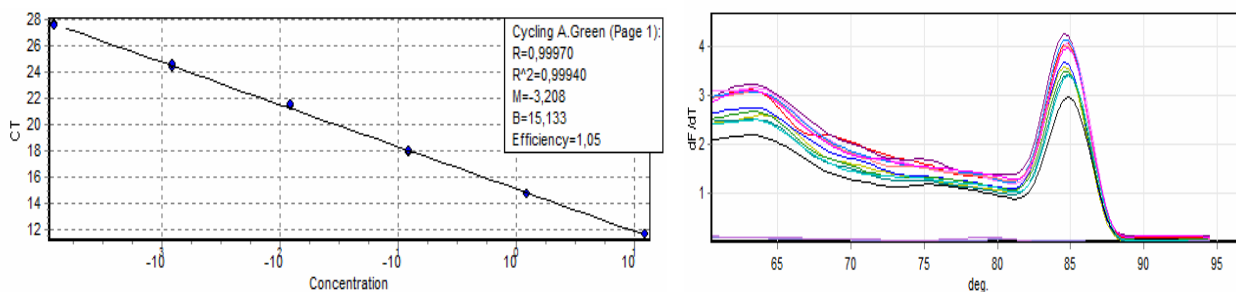
**Figura 6 – Curva padrão *B. vulgatus* ATCC 8482.**



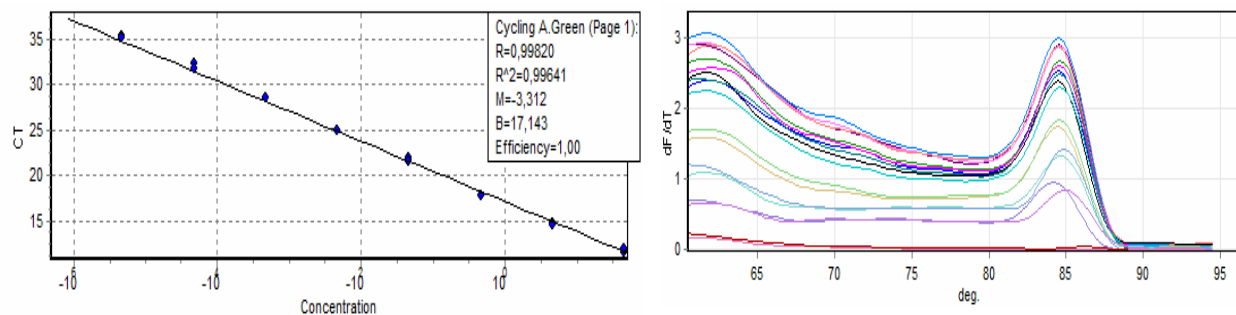
**Figura 7 - Curva padrão *P. distasonis* ATCC 8503.**



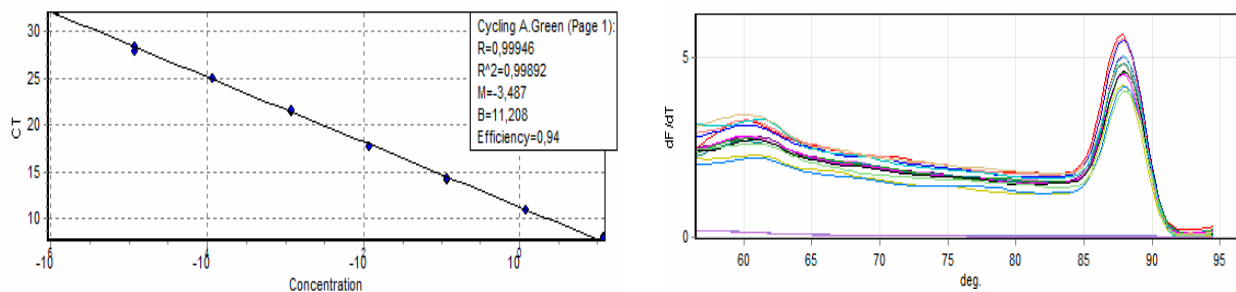
**Figura 8 - Curva padrão *P. merdae* ATCC 43184.**



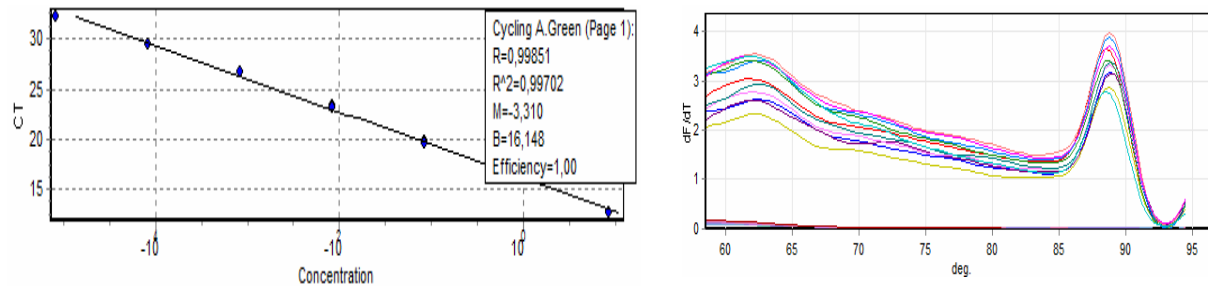
**Figura 9 - Curva padrão *C. perfringens* ATCC 13124.**



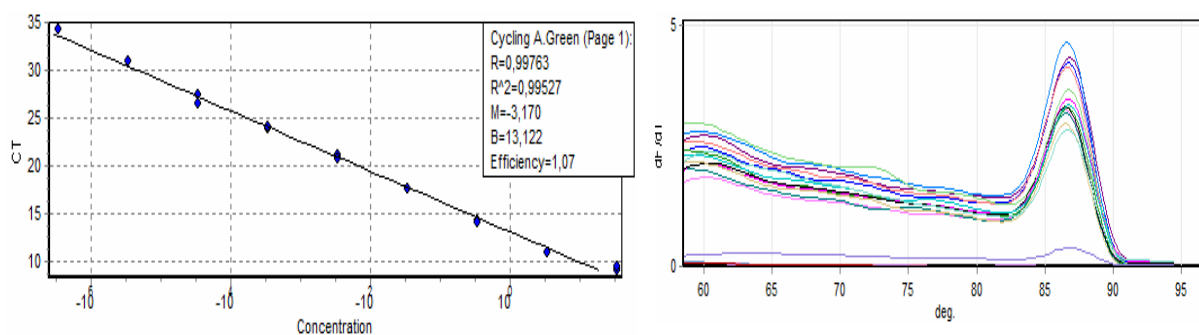
**Figura 10 - Curva padrão *C. difficile* VPI 10468.**



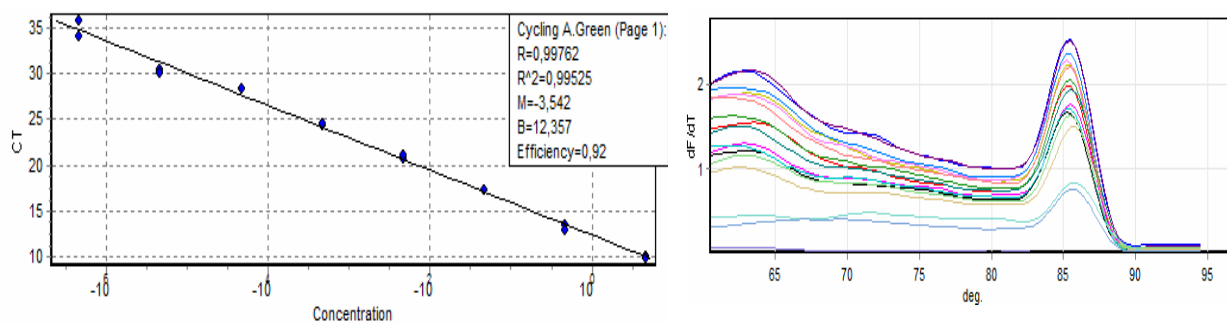
**Figura 11 - Curva padrão *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1696.**



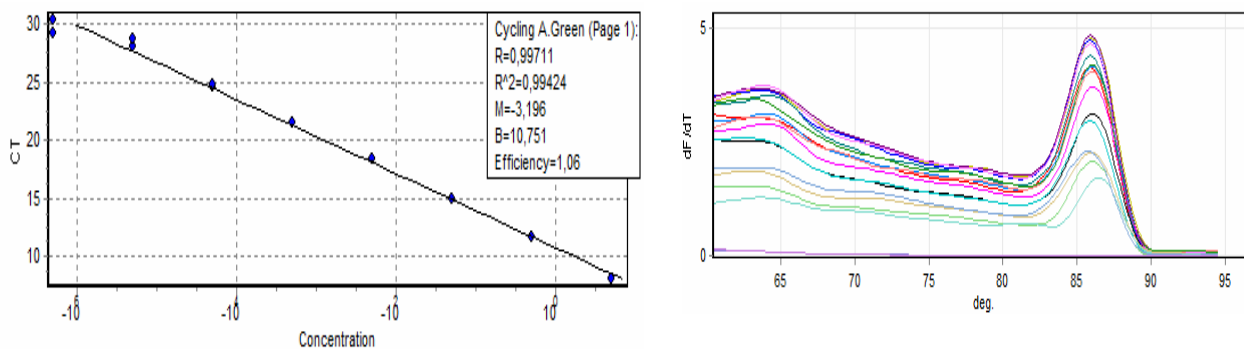
**Figura 12** – Curva padrão *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.



**Figura 13** - Curva padrão Cluster I (*C. perfringens* ATCC 13124).



**Figura 14** – Curva padrão *Bacteroides* spp. (*B. fragilis* ATCC 25285).



**Tabela 4.** Sequências de oligonucleotídeos utilizados na quantificação por qPCR (SybrGreen).

Microrganismos	Oligonucleotídeos 5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Produto (pb)	Referências
<i>B. fragilis</i>	F: TCR GGA AGA AAG CTT GCT R: CAT CCT TTA CCG GAA TCC T	56	162	TONG et al., 2011
<i>B. vulgatus</i>	F: GCA TCA TGA GTC CGC ATG TTC R: TCC ATA CCC GAC TTT ATT CCT T	60	287	WANG et al., 1996
<i>P. distasonis</i>	F: GTC GGA CTA ATA CCG CAT GAA R: TTA CGA TCC ATA GAA CCT TCA T	60	273	WANG et al., 1996
<i>P. merdae</i>	F: AGG GTG CGT AGG TGG TGA T R: TTC ACC GCT ACA CCA CGC	60	122	TONG et al., 2011
<i>Bacteroides</i> spp.	F: GAG GAA GGT CCC CCA CAT TG R: TCC TTC ACG CTA CTT GGC TG	60	113	Deste estudo
<i>C. perfringens</i>	F: TCA TCA TTC AAC CAA AGG AGC AAT CC R: CCT TGG TAG GCC GTT ACC C	60	105	SIRAGUSA et al., 2007
<i>C. difficile</i>	F: ATT AGG AGG AAC ACC AGT TG R: AGG AGA TGT CAT TGG GAT GT	56	307	KANG et al., 2010
Cluster I	F: ATG CAA GTC GAG CGA KG R: TAT GCG GTA TTA ATC TYC CTT T	60	120	RINTTILA et al., 2004
<i>Lactobacillus</i> spp	F: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A R: ATT YCA CCG CTA CAC ATG	60	380	PONNUSAMY et al., 2011
<i>Bifidobacterium</i> spp.	F: GCG TGC TTA ACA CAT GCA AGT C R: CAC CCG TTT CCA GGA GCT ATT	60	125	PONNUSAMY et al., 2011

#### 4.8 Análises estatísticas

Para análises dos dados ordinais que apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) foi empregado o teste de Tukey e para aqueles que apresentaram distribuição assimétrica foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Os dados nominais foram analisados usando o teste de Qui-quadrado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Foi utilizado o programa estatístico BioStat 2009 versão 5.3.5.

## 5 RESULTADOS

Foram coletadas e processadas 30 amostras fecais de crianças eutróficas, 24 com sobrepeso e 30 obesas. Com base nas medidas de peso e altura, juntamente com a determinação do sexo e a data de nascimento, o valor de IMC de cada criança foi calculado através do software WHO Anthro Plus (OMS) e foi possível observar que, como esperado, o IMC foi maior nas crianças obesas e sobrepeso do que nas crianças eutróficas ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, houve diferença significativa para a idade entre todos os grupos (Tabela 5). Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos com relação ao peso ao nascer e comprimento ao nascer.

Ainda em relação ao questionário aplicado (Anexo 1), em função do baixo número de respostas afirmativas ( $\leq 5$ ) para os campos (1) uso de antibiótico nos primeiros seis meses de vida, (2) ocorrência de diabetes gestacional e (3) aumento excessivo de peso durante a gestação, não foi possível verificar o nível de significância ( $p$ ) pelo teste Qui-quadrado e, por esta razão, não estão apresentados na tabela abaixo.

Na avaliação do tipo de amamentação, os dados foram agrupados da seguinte maneira: crianças que foram amamentadas durante os primeiros seis meses de vida somente com o leite materno (amamentação materna exclusiva – AME) e aquelas que foram amamentadas pelo menos nos seis primeiros meses de vida com leite materno e adição de leite de fórmula, sucos, água, entre outros (amamentação materna – AM) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Características das crianças em estudo.

Variáveis	Grupos			Total	p	
	Eutrofia (n=30)	Sobrepeso (n=24)	Obesidade (n=30)			
<b>IMC<sup>b</sup> para a idade</b> (Média±DP <sup>a</sup> )	16,06±1,18	19,67±1,62 <sup>c</sup>	27,12±5,9 <sup>cd</sup>		<b>&lt;0,0001*</b>	
<b>Escore Z do IMC</b> (Média±DP <sup>a</sup> )	0,19 ±0,72	1,68±0,33 <sup>c</sup>	3,5±1,6 <sup>cd</sup>		<b>&lt;0,0001*</b>	
<b>Idade em anos</b> (Média±DP <sup>a</sup> )	6,1±2,4	8,0±2 <sup>c</sup>	8,5±2,6 <sup>c</sup>		<b>0,0008**</b>	
Gênero	Feminino	17 (56,7%)	10 (41,7%)	11 (36,7%)	38 (45,2%)	0,2732***
	Masculino	13 (43,3%)	14 (58,3%)	19 (63,3%)	46 (54,8%)	
Tipo de parto	Cesárea	18 (60%)	14 (5,3%)	20 (66,7%)	52 (61,9%)	0,7928***
	Normal	12 (40%)	10 (41,7%)	10 (33,3%)	32 (38,1%)	
Amamentação materna por 6 meses	Não	15 (50%)	14 (58,3%)	14 (46,7%)	43 (51,2%)	0,7528***
	Sim	15 (50%)	10 (41,7%)	16 (53,3%)	41 (48,8%)	
Amamentação exclusiva materna por 6 meses	Não	27 (90%)	17 (70,8%)	20 (66,7%)	64 (76,2%)	>0,05***
	Sim	3 (10%)	7 (29,2%)	10 (33,3%)	20 (23,8%)	
Utilizou antibiótico	Não	24 (80%)	19 (79,2%)	22 (73,3%)	65 (77,4%)	-
	Sim	6 (20%)	5 (20,8%)	8 (26,7%)	19 (22,6%)	
Diabetes gestacional	Não	27 (90%)	21 (87,5%)	27 (90%)	75 (89,3%)	-
	Sim	3 (10%)	3 (12,5%)	3 (10%)	9 (10,7%)	
Ganho de peso excessivo na gestação	Não	25 (83,3%)	18 (75%)	22 (73,3%)	65 (77,4%)	-
	Sim	5 (16,7%)	6 (25%)	8 (26,7%)	19 (22,6%)	

<sup>a</sup>DP: Desvio Padrão<sup>b</sup>IMC: Índice de massa corpórea para a idade

p: nível de significância do \*Teste de Kruskal-Wallis – c ≠ eutrófico; d ≠ sobrepeso; \*\*Teste de Tukey – c ≠ eutrófico; d ≠ sobrepeso; \*\*\*Teste Qui-quadrado.

No grupo das crianças eutróficas, em 63,3% foram isoladas ao menos uma espécie dos gêneros *Bacteroides* e/ou *Parabacteroides* e 53,3% apresentaram ao menos uma espécie do gênero *Clostridium*. Para os grupos de crianças obesas e com sobrepeso, as porcentagens observadas foram as seguintes: 100% das crianças obesas apresentam *Bacteroides* e/ou *Parabacteroides* e 73,3% apresentam *Clostridium*; 83,3% das crianças com sobrepeso apresentam *Bacteroides* e/ou *Parabacteroides* e 70,8% apresentam *Clostridium*.

Dentre todas as espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas, a espécie *B. vulgatus* foi a mais frequente para todos os grupos estudados, correspondendo a 53% nas eutróficas, 37,5% nos sobrepesos e 65,5% nos obesos (Tabela 6). Também pode ser observada uma maior diversidade de espécies no grupo sobrepeso.

**Tabela 6.** Frequência relativa das espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas entre os grupos.

Espécies	Grupos					
	Eutróficos		Sobrepeso		Obesos	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>B. vulgatus</i>	35	53	27	37,5	76	65,5
<i>B. fragilis</i>	5	7,6	8	11	6	5
<i>B. ovatus</i>	1	1,5	10	14	7	6
<i>B. caccae</i>	∅	∅	2	3	∅	∅
<i>B. uniformis</i>	∅	∅	2	3	∅	∅
<i>B. stercoris</i>	6	9,1	∅	∅	∅	∅
<i>P. distasonis</i>	14	21,2	19	26	25	21,5
<i>P. merdae</i>	5	7,6	4	5,5	2	1,7
<b>Total de isolados</b>	<b>66</b>		<b>72</b>		<b>116</b>	

∅: ausência da espécie nas amostras analisadas.

Já para o gênero *Clostridium*, a espécie *C. perfringens* foi a mais frequente nos grupos eutróficos e obesos, correspondendo a 41,3% e 40,7%, respectivamente. Entre as crianças com sobrepeso observou-se maior frequência de *Clostridium* spp. (37,5%) seguido por *C. perfringens* (29,2%). A identificação das espécies isoladas para cada um dos grupos está apresentada na Tabela 7.

**Tabela 7.** Frequência relativa das espécies de *Clostridium* isoladas entre os grupos.

Espécies	Grupos					
	Eutróficos		Sobrepeso		Obesos	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>C. perfringens</i>	19	41,3	14	29,2	24	40,7
<i>C. clostridioforme</i>	3	6,5	2	4,2	5	8,5
<i>C. glycolicum</i>	3	6,5	1	2,1	∅	∅
<i>C. innocuum</i>	2	4,3	8	16,6	4	6,8
<i>C. sordelli</i>	1	2,2	∅	∅	∅	∅
<i>C. paraputrificum</i>	4	8,7	1	2,1	2	3,4
<i>C. baratii</i>	∅	∅	1	2,1	3	5,1
<i>C. difficile</i>	∅	∅	1	2,1	1	1,7
<i>C. sporogenes</i>	1	2,2	2	4,2	∅	∅
<i>C. septicum</i>	∅	∅	∅	∅	1	1,7
<i>C. tertium</i>	∅	∅	∅	∅	1	1,7
<i>Clostridium</i> spp.	13	28,3	18	37,5	18	30,5
<b>Total de isolados</b>	<b>46</b>		<b>48</b>		<b>59</b>	

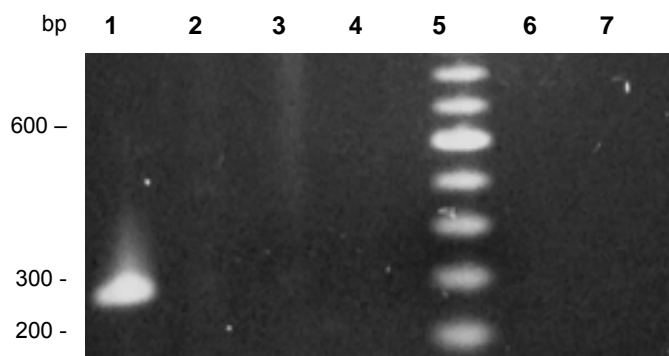
∅: ausência da espécie nas amostras analisadas.

Como apresentado na Tabela 6 foram isoladas 19 cepas de *B. fragilis*, sendo 5 de crianças eutróficas, 8 do grupo dos sobrepesos e 6 dos obesos. Em nenhum dos isolados foi detectado o gene *bft* da fragilisina, o que caracterizou as cepas como *B. fragilis* não-enterotoxigênicos (NTBF) (Figura 15). Na determinação dos



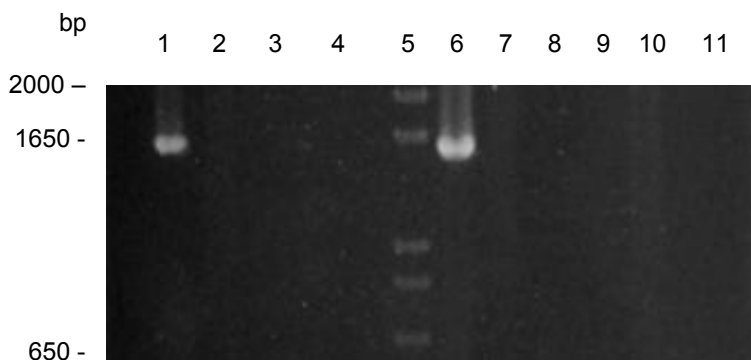
padrões NTBF, 10 (52,63%) isolados não apresentaram produto de PCR e foram classificados como NTBF II enquanto os 9 (47,36%) isolados restantes apresentaram o produto de 1,6 kb e, sendo, classificados NTBF III (Figura 16)

**Figura 15** - Detecção do gene *bft* da fragilisina



Colunas: (1) controle positivo *B. fragilis* GAI 97124; (2) controle negativo *B. fragilis* ATCC 25285; (3, 4, 6 e 7) amostras clínicas; (5) padrão de peso molecular: 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

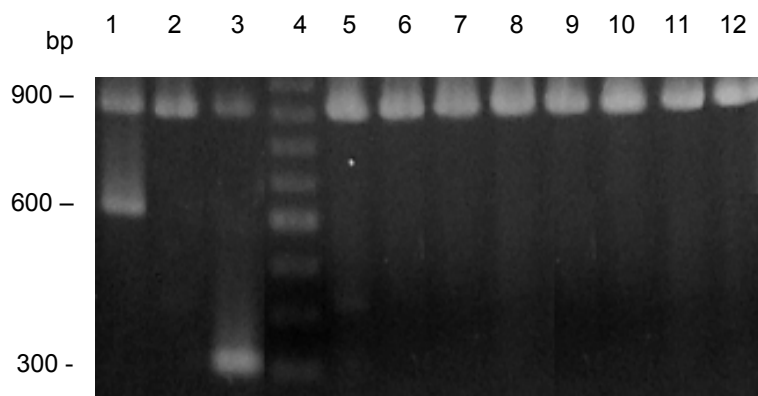
**Figura 16** – Determinação dos padrões *B. fragilis* não-enterotoxigênico (NTBF).



Colunas: (1) controle positivo *B. fragilis* ATCC 25285 padrão III; (2-4) amostras clínicas padrão II; (5) padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; (6) amostra clínica padrão III; (7-11) amostras clínicas padrão II.

Para a toxintipagem de *C. perfringens* um total de 57 isolados foi avaliado, sendo 19 de eutróficos, 14 de sobrepesos e 24 de obesos. Todas as cepas amplificaram apenas o gene da toxina alfa (*plc*) e, portanto, foram classificadas como toxintipo A (Figura 17).

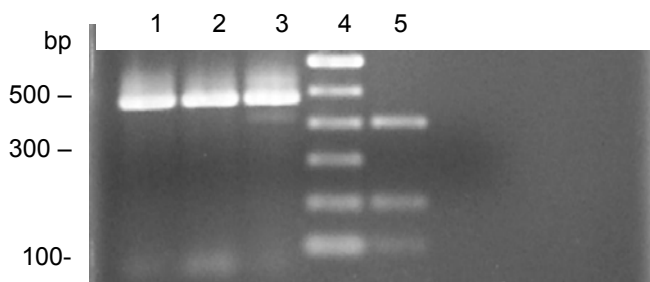
**Figura 17** – Multiplex dos toxinotipos *C. perfringens*.



Colunas: (1) Cp C (toxinotipo C); (2) *C. perfringens* ATCC 13124 (toxinotipo A), (3) Cp E (toxinotipo E); (4) padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (5-12) amostras clínicas.

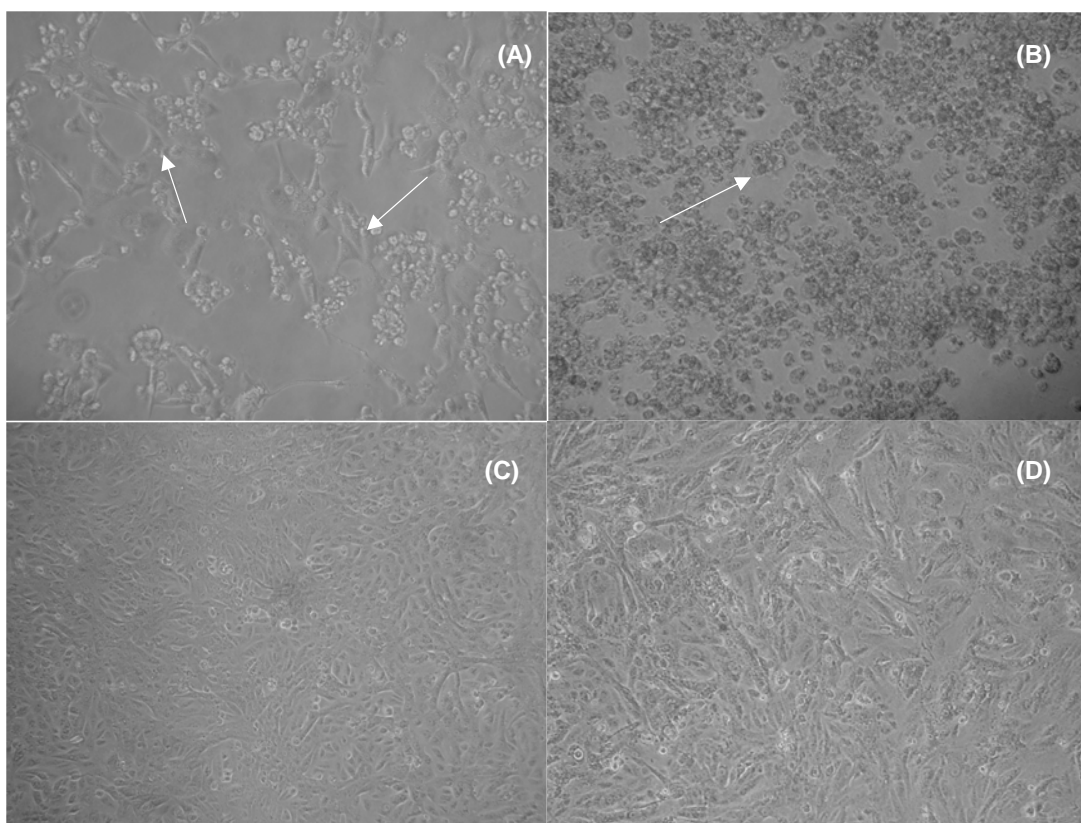
Dos 57 isolados de *C. perfringens* 5 (3 de eutróficos, 1 sobrepeso e 1 obeso) foram positivos na detecção do gene *tpeL* (Figura 18) e para confirmação da detecção, todos os produtos da PCR foram sequenciados, apresentando 99% de identidade com a sequência do gene *tpeL* depositada no GenBank (acesso: AB262081.1) para todas as amostras. Para avaliar a citotoxicidade destes isolados, os sobrenadantes foram incubados em células Vero, e fotografados após 24, 48 e 72 horas de incubação. Três dos cinco isolados apresentaram efeito citotóxico característico, células alongadas e arredondamento celular após 72 h de incubação (Figura 19).

**Figura 18** – Detecção do gene *tpeL* em isolados de *C. perfringens*.



Colunas: (1) controle positivo *C. perfringens* JGS 5369; (2-3) amostras clínicas positivas; (4) padrão de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); (5) amostra clínica negativa para o gene *tpeL*.

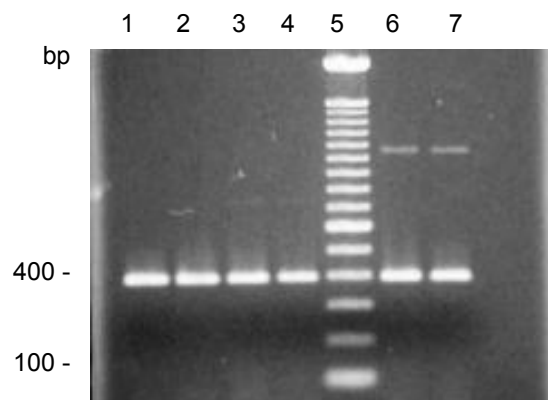
**Figura 19** – Efeito citotóxico de *C. perfringens plc<sup>+</sup>/tpeL<sup>+</sup>* em células Vero.



(A) isolado *C. perfringens plc<sup>+</sup>/tpeL<sup>+</sup>* (72 h); (B) isolado *C. perfringens plc<sup>+</sup>/tpeL<sup>-</sup>* (72 h); (C) células Vero com BHI (72 h); (D) células Vero (72 h). Aumentos: A, B e D 2000X; C 1000X. Setas indicam o efeito citotóxico observado em A e B.

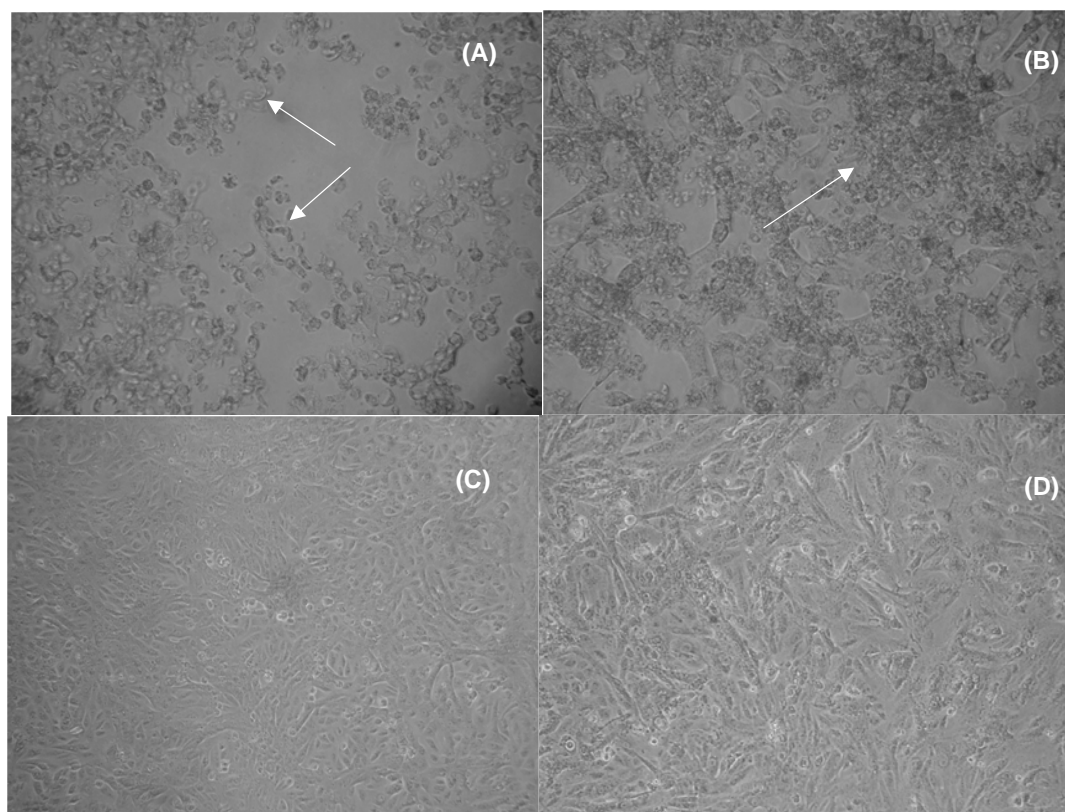
Um total de 7 (12,2%) isolados foram positivos para o gene *netB*, sendo 4 encontrados em eutróficos, 1 em sobrepeso e 2 em obesos (Figura 20). Da mesma forma que para os isolados *tpeL<sup>+</sup>*, todos os produtos da PCR foram sequenciados e a identidade confirmada a partir do pareamento com a sequência do gene depositada no GenBank, obtendo-se 99% de identidade (acesso: JQ655731.1). Em seguida, isolados *netB<sup>+</sup>* foram avaliados quanto a sua citotoxicidade através da incubação do sobrenadante em cultura de células Vero, em que todos apresentaram efeito citotóxico diferente da toxina alfa (Figura 21).

**Figura 20** – Detecção do gene *netB* em isolados de *C. perfringens*.



Colunas (1) Controle positivo *C. perfringens* EHE-NE-18; (2-4) amostras clínicas; (5) padrão de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); (6-7) amostras clínicas.

**Figura 21** – Efeito citotóxico de *C. perfringens* *plc*<sup>+</sup>/*netB*<sup>+</sup> em células Vero.



(A) isolado *C. perfringens* *plc*<sup>+</sup>/*netB*<sup>+</sup> (72 h); (B) isolado *C. perfringens* ATCC 13124 *plc*<sup>+</sup>/*netB*<sup>-</sup> (72 h); (C) células Vero com BHI (72 h); (D) células Vero (72 h). Aumentos: A, B e D 2000X; C 1000X. Setas indicam o efeito citotóxico observado em A e B.

Para avaliação quantitativa e comparativa da presença dos microrganismos mencionados no material e métodos foi realizada a reação de PCR em tempo real a partir do DNA total extraído das fezes. As análises dos resultados de quantificação dos microrganismos revelaram que para nenhum dos grupos houve homogeneidade nos resultados (não seguem distribuição normal), o que nos levou a optar por modelos estatísticos não-paramétricos.

Os resultados da quantificação apresentados na Tabela 8 revelam que o número de cópias/g de fezes de *Bacteroidales*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. difere para os grupos com sobrepeso e obesos em relação aos eutróficos, mas não houve diferenças entre as crianças com sobrepeso e obesas. Não foram verificadas diferenças significantes para as espécies *B. fragilis*, *B. vulgatus* e *P. distasonis* e Cluster I entre os grupos.

**Tabela 8.** Quantificação por PCR em Tempo-Real das amostras fecais.

Microrganismos	Número de cópias/g de fezes mediana (desvio interquartilico) <sup>b</sup>		
	Eutróficos	Sobrepesos	Obesos
<i>Bacteroidales</i> *	9,6E+08 (7,6E+08)	1,5E+09 (1,2E+09) <sup>a</sup>	1,6E+09 (1,1E+09) <sup>a</sup>
<i>B. fragilis</i>	4,3E+06 (3,7E+07)	3,9E+06 (7,0E+07)	4,3E+06 (3,0E+07)
<i>B. vulgatus</i>	1,6E+07 (7,6E+07)	1,3E+07 (6,4E+07)	1,9E+07 (6,3E+07)
<i>P. distasonis</i>	8,4E+03 (1,8E+06)	2,1E+03 (1,2E+05)	3,0E+05 (1,8E+06)
Cluster I	2,8E+04 (1,5E+05)	1,1E+04 (9,6E+04)	1,2E+04 (1,6E+05)
<i>C. perfringens</i> *	7,8E+05 (1,7E+06)	1,4E+05 (5,6E+05) <sup>a</sup>	2,3E+05 (1,5E+06) <sup>a</sup>
<i>C. difficile</i> *	1,1E+03 (2,1E+03)	1,5E+02 (1,3E+03) <sup>a</sup>	9,4E+02 (2,0E+03) <sup>a</sup>
<i>Bifidobacterium</i> spp.*	4,4E+07 (1,3E+08)	7,8E+06 (6,0E+07) <sup>a</sup>	1,2E+07 (6,0E+07) <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus</i> spp.*	1,9E+05 (5,9E+05)	3,3E+05 (2,6E+06) <sup>a</sup>	5,3E+05 (3,2E+06) <sup>a</sup>

\*Nível de significância do teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,05$

a ≠ eutrófico

b: desvio interquartilico – amplitude da ocorrência da metade intermediária dos dados

Para observar a possível associação entre as variáveis quantitativas estudadas e a concentração de bactérias obtidas pelo PCR foi utilizado o teste de correlação de Spearman (Tabela 9). Da mesma forma, para verificar se há associação entre o estado nutricional da criança e os resultados obtidos no qPCR foi empregado os valores do escore Z, como recomendado pela OMS (WHO, 2006).

Houve associação positiva entre idade e escore Z e, conseqüentemente, também houve associação entre idade e as variáveis peso e altura. Estes resultados indicam que à medida que a idade da criança aumenta tais variáveis também aumentam. Curiosamente, quando segmentamos as correlações nos três grupos têm-se o seguinte resultado para correlação idade e escore Z: eutróficos ( $r_s=0,37$ ,  $p=0,04$ ), sobrepesos ( $r_s=0,71$ ;  $p<0,001$ ) e obesos ( $r_s=0,53$ ,  $p=0,002$ ). Podemos concluir que a relação entre idade e a variação do peso é muito mais forte nas crianças com sobrepeso e obesas, sugerindo que o ganho de peso não controlado durante o crescimento tende a resultar em aumento no IMC em crianças mais velhas.

Na associação entre a idade e as bactérias, foi observado correlação pequena ( $r_s=0,37$ ), direta ( $r_s$  positivo) e significativa ( $p<0,05$ ) para o gênero *Lactobacillus*, o que não nos permite descartar que a idade esteja influenciando os resultados da quantificação. Para os demais dados não foi observado correlação significativa entre as bactérias e idade ( $p<0,05$ ). Também foi observada correlação significativa entre o Z escore e *Bacteroidales*, e Z escore e *C. perfringens* (Tabela 9).

O mesmo teste estatístico foi empregado para avaliar a possível associação entre as quantificações das bactérias estudadas. A Tabela 10 mostra que a correlação entre algumas bactérias, quando presente (significativa -  $p<0,05$ ) é na sua maioria pequena e direta, sendo a correlação negativa e moderada apenas entre *Bacteroidales* e *C. perfringens*.

**Tabela 9.** Correlação de Spearman (rS) e nível de significância (valor de  $p$ ) entre algumas variáveis estudadas.

	Escore Z	Idade	Peso	Altura	Peso ao nascer	Comprimento ao nascer
Idade	<b>0,28</b> ( $p=0,0088$ )					
Peso (Kg)	<b>0,68</b> ( $p<0,00001$ )	<b>0,75</b> ( $p<0,00001$ )				
Altura (cm)	<b>0,44</b> ( $p=0,00003$ )	<b>0,84</b> ( $p<0,00001$ )	<b>0,92</b> ( $p<0,00001$ )			
Peso ao nascer	0,04 ( $p=0,6959$ )	-0,07 ( $p=0,5420$ )	0,06 ( $p=0,6032$ )	0,02 ( $p=0,8354$ )		
Comprimento ao nascer	0,21 ( $p=0,0931$ )	-0,02 ( $p=0,9034$ )	0,2 ( $p=0,1088$ )	0,17 ( $p=0,1918$ )	<b>0,46</b> ( $p=0,0001$ )	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	-0,22 ( $p=0,0493$ )	-0,11 ( $p=0,332$ )	-0,15 ( $p=0,1595$ )	-0,14 ( $p=0,1982$ )	-0,18 ( $p=0,0996$ )	-0,14 ( $p=0,26391$ )
<i>Lactobacillus</i> spp.	<b>0,29</b> ( $p=0,0083$ )	<b>0,37</b> ( $p=0,0004$ )	<b>0,46</b> ( $p=0,00001$ )	<b>0,41</b> ( $p=0,0001$ )	-0,09 ( $p=0,4148$ )	-0,1 ( $p=0,4113$ )
<i>C. perfringens</i>	<b>-0,23</b> ( $p=0,0321$ )	0,01 ( $p=0,947$ )	-0,2 ( $p=0,0738$ )	-0,13 ( $p=0,2326$ )	-0,03 ( $p=0,7619$ )	0,03 ( $p=0,7901$ )
<i>C. difficile</i>	-0,08 ( $p=0,45068$ )	0,2 ( $p=0,06369$ )	0,02 ( $p=0,8221$ )	0,03 ( $p=0,75349$ )	-0,11 ( $p=0,33495$ )	0,13 ( $p=0,32485$ )
Cluster I	-0,08 ( $p=0,48658$ )	0,06 ( $p=0,57484$ )	0,02 ( $p=0,87224$ )	-0,01 ( $p=0,96062$ )	0,06 ( $p=0,61741$ )	-0,11 ( $p=0,38351$ )
<i>P. distasonis</i>	0,06 ( $p=0,98767$ )	-0,04 ( $p=0,72267$ )	0,02 ( $p=0,83859$ )	-0,01 ( $p=0,92075$ )	0,04 ( $p=0,73293$ )	0,07 ( $p=0,59351$ )
<i>B. fragilis</i>	-0,05 ( $p=0,65418$ )	-0,14 ( $p=0,20427$ )	-0,16 ( $p=0,14917$ )	-0,21 ( $p=0,05959$ )	0,09 ( $p=0,43497$ )	-0,01 ( $p=0,91522$ )
<i>B. vulgatus</i>	-0,05 ( $p=0,66089$ )	-0,05 ( $p=0,62591$ )	-0,07 ( $p=0,50141$ )	-0,05 ( $p=0,62663$ )	-0,06 ( $p=0,56196$ )	-0,07 ( $p=0,59669$ )
<i>Bacteroidales</i>	<b>0,3</b> ( $p=0,0061$ )	-0,06 ( $p=0,58605$ )	0,12 ( $p=0,27735$ )	-0,02 ( $p=0,84187$ )	0,05 ( $p=0,66084$ )	-0,03 ( $p=0,82468$ )

Em negrito = correlações significantes, considerar:  $rS < 0,20$  – correlação insignificante; entre 0,21 e 0,40 – correlação pequena; entre 0,41 e 0,70 – correlação moderada; entre 0,71 e 0,90 – correlação alta; e  $rS > 0,90$  – correlação muito alta ou perfeita.

**Tabela 10.** Correlação de Spearman (rS) e nível de significância (valor de p) entre as bactérias estudadas.

	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>	Cluster I	<i>P. distasonis</i>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. vulgatus</i>
<i>Lactobacillus</i>	0,07 (p=0,5552)							
<i>C. perfringens</i>	0,18 (p=0,1057)	-0,14 (p=0,2057)						
<i>C. difficile</i>	0,17 (p=0,1295)	<b>0,23</b> <b>(p=0,0346)</b>	0,21 (p=0,0504)					
Cluster I	0,14 (p=0,2036)	0,04 (p=0,6926)	<b>0,38</b> <b>(p=0,0003)</b>	0,16 (p=0,15)				
<i>P. distasonis</i>	0,21 (p=0,0557)	0,02 (p=0,8336)	0,05 (p=0,6235)	0,01 (p=0,96)	<b>0,22</b> <b>(p=0,0407)</b>			
<i>B. fragilis</i>	0,17 (p=0,1296)	-0,06 (p=0,5963)	0,16 (p=0,1524)	0,01 (p=0,91)	0 (p=0,9873)	<b>0,24</b> <b>(p=0,0248)</b>		
<i>B. vulgatus</i>	<b>0,23</b> <b>(p=0,0353)</b>	0,05 (p=0,6758)	0,06 (p=0,6132)	-0,03 (p=0,77)	0,07 (p=0,5033)	0,12 (p=0,2825)	0,09 (p=0,4253)	
<i>Bacteroidales</i>	-0,09 (p=0,3917)	0,21 (p=0,0499)	<b>-0,44</b> <b>(p=0,00003)</b>	0,03 (p=0,80)	-0,02 (p=0,8582)	0,13 (p=0,2292)	0,09 (p=0,4241)	0,01 (p=0,9391)

Em negrito = correlações significantes, considerar: rS <0,20 – correlação insignificante; entre 0,21 e 0,40 – correlação pequena; entre 0,41 e 0,70 – correlação moderada; entre 0,71 e 0,90 – correlação alta; e rS >0,90 – correlação muito alta ou perfeita



Por fim, foi analisado se gênero, faixa etária, tipo de parto, amamentação nos primeiros seis meses, ocorrência de diabetes gestacional, ganho de peso excessivo na gestação e o uso de antibiótico nos primeiros seis meses de vida poderiam influenciar as concentrações das bactérias. Para isso, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes.

Para as variáveis que apresentaram valor de  $p$  significativo foi visto que as meninas apresentaram maior concentração de *Bifidobacterium* spp. que os meninos (medianas  $5,0E+07$  e  $8,2E+06$ , respectivamente). Dividindo as crianças nas faixas etárias de 3 a 6 anos e de 7 a 12 anos foi possível verificar maior número de *Lactobacillus* (medianas  $1,8E+05$  e  $5,4E+05$ , respectivamente) e *C. difficile* (medianas  $2,3E+02$  e  $1,1E+03$ , respectivamente) nas crianças de maior faixa etária.

*C. perfringens* encontra-se em maior número em crianças nascidas de parto normal (mediana  $1,3E+06$ ) do que em nascidos de parto cesárea (mediana  $3,1E+05$ ). Também foi visto que aqueles que foram amamentados não apenas com leite materno nos primeiros seis meses de vida apresentam maior número de *C. difficile* em relação aos que mamaram exclusivamente o leite da mãe (medianas  $9,4E+02$  e  $2,2E+02$ , respectivamente).

## 6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas a prevalência de sobrepeso/obesidade vem aumentando gradativamente no mundo todo, sendo o problema de saúde pública de crescimento mais rápido dentre as doenças não comunicáveis (WHO, 2012). A gravidade em adquirir excesso de peso consiste no fato de que a obesidade é uma doença crônica que representa fator de risco para outras doenças como as cardiovasculares, hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia, asma, infecções e etc. (FALAGAS; KOMPOTI, 2006; MATOS et al., 2011).

Como já mencionado, o Brasil apresenta um quadro de transição do estado nutricional de adultos e crianças, havendo diminuição da prevalência da desnutrição e aumento da obesidade e sobrepeso (IBGE, 2010). É consenso que a obesidade infantil acarreta diversas complicações à saúde da criança, muitas delas observadas também em adultos como, por exemplo, o diabetes; e que uma criança obesa está mais propensa a se tornar um adulto com excesso de peso (OLIVEIRA; FISBERG, 2003).

A literatura aponta para três períodos críticos para o desenvolvimento da obesidade: (1) o primeiro um ano de vida, em que a ganho acelerado de peso em crianças nascidas com baixo peso (<2,500 g) ou que se recuperaram de alguma enfermidade, provoca intensa formação de tecido adipocitário e altera suas funções endócrinas; (2) entre os 4 e 6 anos de idade, período conhecido como rebote da adipocidade, quando fatores genéticos, alimentares e comportamentais influem na hiperplasia das células do tecido adiposo; (3) na adolescência, quando os hormônios sexuais determinam o acúmulo de gordura nas meninas e de massa magra nos meninos (MATOS, 2011; MELLO; LUFT; MEYER, 2004; OLIVEIRA et al., 2003).

Muitos trabalhos relacionaram o ganho de peso na infância a fatores genéticos, hábitos alimentares dos pais e nível de atividade física (MATOS et al., 2011, OLIVEIRA et al., 2003). São recentes os estudos que tentaram compreender a associação entre a composição da microbiota intestinal e a obesidade (KARLSOON et al., 2012, MILLION et al., 2013). Por outro lado, a maioria dos estudos epidemiológicos sobre obesidade infantil não investigaram

o papel da microbiota intestinal endógena juntamente com o questionamento de variáveis qualitativas, e o papel de ambas no seu desenvolvimento, como verificado neste projeto de pesquisa.

Com os resultados deste trabalho pôde-se observar que embora a prevalência de sobrepeso e obesidade tenha sido maior em meninos (58,3% e 63.3%, respectivamente) não houve diferença significativa em relação ao sexo (Tabela 5). Segundo os dados coletados pela POF 2008-2009 a prevalência de excesso do peso em função ao sexo está associada à renda per capita, em que os meninos de classes sociais mais altas apresentam maior prevalência de excesso de peso do que as meninas (IBGE, 2010). Entretanto o presente estudo não avaliou a renda familiar para também poder estabelecer esta correlação.

Mesmo tendo sido observada diferença significativa para os valores de IMC entre os grupos estudados, não houve diferenças significantes entre as demais variáveis qualitativas estudadas (Tabela 5), concluindo-se que para este grupo de crianças o ganho de peso pode ser influenciado por outros fatores qualitativos não verificados, como por exemplo, renda familiar, escolaridade materna e dieta; ou ser consequência do baixo número de indivíduos, pois trabalhos que conseguiram mostrar associação entre ganho de peso e tipo de parto, sexo e aleitamento materno avaliaram uma amostragem de crianças extramente maior (BARROS, et al., 2012, MATOS et al., 2011, OLIVEIRA et al., 2003).

Também, nossos resultados sugerem que a ocorrência de sobrepeso e obesidade é majoritariamente encontrada em crianças a partir dos oito anos de idade (Tabela 5). Assim, quando dizemos que as crianças eutróficas são mais novas que as com sobrepeso e obesas, não seria possível descartar que a idade poderia influenciar os resultados significantes obtidos. Portanto, foram feitas análises de correlação (Teste de correlação de Spearman – rS) para saber se existe associação entre a idade e as demais variáveis (Tabela 9).

Foi observado que existe fraca correlação positiva entre idade e o escore Z ( $rS=0,28$ ;  $p<0,0001$ ) entretanto, este resultado pode ser indicativo de que o não tratamento do quadro de sobrepeso leva ao desenvolvimento da obesidade infantil conforme o crescimento. Esta observação corrobora com um

estudo realizado em Salvador, cujos resultados sugerem que o aumento gradativo do risco para sobrepeso/obesidade em crianças entre 4 e 11 anos de idade está relacionado com o aumento da idade, mesmo em crianças de baixa renda (MATOS et al., 2011).

Pesquisas que buscaram associar a presença de microrganismos com o desenvolvimento da obesidade e sobrepeso, verificam que os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram frequentemente mencionados, sugerindo que espécies pertencentes a estes filos possam ser marcadores destes quadros nutricionais. Na tentativa de verificar esta observação, avaliou-se mais detalhadamente a presença de espécies dos gêneros *Clostridium*, *Bacteroides* e *Parabacteroides*, uma vez que estes são os principais representantes dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, respectivamente, encontrados no intestino de humanos e de outros mamíferos. Além disso, avaliou-se também a presença dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* devido sua representatividade na infância (ECKBURG et al., 2005, HOYLES AND McCARTNEY, 2009).

Neste estudo, das 84 amostras analisadas, foram isoladas 254 cepas pertencentes às espécies *B. vulgatus*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. caccae*, *B. uniformis*, *B. stercoris*, *P. distasonis* e *P. merdae*. Em relação ao gênero *Clostridium* foram identificadas às espécies *C. perfringens*, *C. clostridioforme*, *C. glycolicum*, *C. innocuum*, *C. sordelli*, *C. paraputrificum*, *C. baratii*, *C. difficile*, *C. sporogenes*, *C. septicum* e *C. tertium* totalizando 153 cepas.

Ainda que pouco empregado atualmente, com o método de isolamento pode-se obter o microrganismo e a partir de sua cultura pura é possível realizar estudos das características fisiológicas/fenotípicas e genotípicas das cepas, como a presença de genes codificadores de enterotoxinas e o efeito citotóxico das toxinas produzidas. Sendo assim, a partir das culturas puras de *C. perfringens* e *B. fragilis*, principais espécies de importância médica de cada um dos gêneros, analisou-se a presença de isolados *B. fragilis* enterotoxigênicos (ETBF) e dos toxinotipos de *C. perfringens*, distribuídos na população em estudo.

Isolados ETBF são amplamente estudados por serem associados a quadros de diarreia em humanos e animais (NAKANO et al., 2007, WICK AND SEARS, 2000). Não obstante, *Bacteroides fragilis* não-enterotoxigênico (NTBF)

são importantes colonizadores do intestino, pois através de açúcares específicos em sua cápsula participam ativamente do estabelecimento de tolerância e maturação imunológica (SHEN et al., 2012), e por isso de grande interesse nos estudos da relação hospedeiro-microbiota necessário para condição de equilíbrio.

Embora os isolados ETBF sejam encontrados comumente em quadros de diarreia, um trabalho recente do nosso grupo identificou a presença de cepas enterotoxigênicas em crianças saudáveis (MERINO et al., 2011), o que aponta para a possibilidade de crianças albergarem estes isolados.

A sequência de nucleotídeos da região flanqueadora de 12 Kb e a ilha de patogenicidade BfPAI são elementos móveis capazes de se mobilizar independentemente um do outro, assim admite-se que isolados NTBF padrão III podem ser resultante da perda da ilha, como também podem eventualmente adquiri-la e com isso, tornar-se um ETBF. Importante salientar que a capacidade de sintetizar a fragilisina depende da presença da ilha BfPAI e de sua região flanqueadora (FRANCO et al., 1999, FRANCO et al., 2002).

Em 2008, Miranda e colaboradores avaliaram uma coleção de isolados obtidos no período de 1980-2008, de pacientes hospitalizados na cidade do Rio de Janeiro, e verificaram que a emergência de ETBF juntamente com aumento da prevalência de NTBF III ocorreu entre 2000-2008. Desta forma, fazer a pesquisa destes isolados torna-se importante para elucidar as relações entre este microrganismo e seu hospedeiro.

No nosso estudo, não foram encontradas cepas ETBF o que pode ser justificado pela ausência de diarreia nos indivíduos estudados. Possivelmente a divergência de resultados aqui observada com o trabalho de Merino et al. (2011) se deve, principalmente, ao fato de que a identificação de isolados ETBF por Merino e colaboradores foi realizada apenas pela técnica de PCR em tempo real, que é uma técnica mais sensível quando comparada ao método de isolamento e cultivo.

Além disso, a proporção semelhante de NBTF padrão II e III (52,63% e 47,36%, respectivamente) estão de acordo com os resultados de Miranda et al. (2008) e, também, corrobora com a ausência de EBTF, uma vez que NTBF III

são mais prevalentes em regiões cuja incidência de isolados enterotoxigênicos é alta (FRANCO et al., 1999).

*C. perfringens* pode ser classificado em cinco toxinotipos (Tabela 1), sendo o toxinotipo A, que codifica apenas para a toxina alfa, o mais frequentemente encontrado na microbiota de humanos saudáveis; estando os demais toxinotipos intimamente relacionados com quadros de doenças entéricas em animais de criação como aves, porcos e ovelhas (CARMAN et al., 2008, UZAL et al., 2008), desta forma, nossos resultados estão de acordo com a literatura.

A presença de um microrganismo enterotoxigênico como colonizador do intestino de um indivíduo saudável é tema de muitas controvérsias. Amimoto et al. (2007), por exemplo, quando descobriu a toxina TpeL associou a presença de isolados que albergavam este gene com quadros mais acentuados de enterite necrótica em frangos. O mesmo foi sugerido por Keyburn et al. (2009) ao descobrir a toxina NetB. Contudo, a presença de *C. perfringens tpeL<sup>+</sup>* e *netB<sup>+</sup>* já foi relatada em fezes de animais saudáveis (ABILDGAARD et al., 2009; COURSDON et al., 2011), indicando que a presença do gene pode não ser suficiente para sua expressão.

Até o presente momento, o isolamento e estudo do efeito citotóxico das toxinas TpeL e NetB sintetizadas por isolados obtidos de fezes humanas ainda não foi reportado, sendo este o primeiro relato. Desta forma, ensaios adicionais da expressão dos genes bem como a purificação destas toxinas devem ser realizados.

A partir do isolamento de espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides*, os nossos resultados revelaram que obesos apresentam menor diversidade de espécies em relação aos outros grupos (Tabela 6). Diante disto, levantou-se a hipótese de que as espécies mais frequentes no grupo obeso estariam em maior número de cópias/grama de fezes, entretanto, isso não foi observado. Como mostrado na Tabela 8, não foi encontrada nenhuma diferença significativa para as espécies *B. fragilis*, *B. vulgatus* e *P. distasonis* entre os grupos, apontando a homogeneidade destas espécies entre as crianças.

Possivelmente a diminuição da diversidade nos obesos apontada na literatura (BACKED, 2009) não é consequência do maior número de cópias das

espécies isoladas, mas sim devido a pequenas quantidades ou ausência de espécies que não foram isoladas no cultivo para este grupo. Desta forma, foram desenhados oligonucleotídeos para a detecção de qualquer espécie obtida com isolamento, na tentativa de encontrar maior quantidade de *Bacteroidales* nos eutróficos.

Surpreendentemente, os grupos sobrepeso e obeso apresentaram maior quantidade ( $p < 0,05$ ) de *Bacteroidales* (Tabela 8). Sabe-se que apenas 10-50% das bactérias associadas à saúde humana são cultiváveis (BERVOETS et al., 2013), podendo então haver alguma espécie não cultivável dentro da ordem *Bacteroidales* que está em maior quantidade nos grupos com aumento de peso e que foi detectada apenas no qPCR.

Em contrapartida, o mesmo não foi observado para os resultados de isolamento de espécies de *Clostridium*, em que houve homogeneidade na presença de espécies em cada grupo (Tabela 7), embora para os resultados de qPCR obteve-se diferenças significantes entre os grupos para *C. perfringens* e *C. difficile*, estando em maior quantidade nos eutróficos (Tabela 8). Também, diferente do que aconteceu para as análises de *Bacteroides* e *Parabacteroides*, quando usado um par de oligonucleotídeos para detecção de várias espécies isoladas em cultivo para *Clostridium* (Cluster I) não houve diferenças significantes entre os grupos, possivelmente porque outras espécies pertencentes a este agrupamento compensam as diferenças individuais de *C. perfringens*.

Ainda que modelos animais e estudos com humanos tenham apontado para um aumento na proporção de *Firmicutes* em relação aos *Bacteroidetes* em sobrepesos/obesos (BACKHED et al., 2004; LEY 2010; XU et al., 2012) o nosso trabalho não avaliou os filos e sim representantes que poderiam ser usados mais especificamente como marcadores das alterações da microbiota quando ocorre aumento de peso. Outros trabalhos que também buscaram a espécie responsável pelas diferenças estatísticas encontradas nestes dois filos apontam para resultados divergentes dos nossos e entre si, cada qual destacando uma espécie (BERVOETS et al., 2013; VAEL et al., 2011), mostrando as dificuldades deste tipo de análise.

Contudo, esta dificuldade não foi encontrada na avaliação dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Assim como na literatura, nossos resultados revelaram maior quantidade de *Bifidobacterium* spp. nas crianças eutróficas e maior número de *Lactobacillus* spp. em sobrepesos/obesos (Tabela 8) (BERVOETS et al. 2013; MILLION et al., 2012; MILLION et al., 2013; SEPP et al., 2013). Porém, em pesquisas mais detalhadas as divergências aparecem novamente.

Em um trabalho com crianças de até 7 anos foi visto que aquelas que tinha IMC ideal para a idade apresentavam maiores quantidades de *Bifidobacterium* spp. em relação as com excesso de peso. No entanto, quando a busca pelas espécies responsáveis por tal diferença foi feita, nenhuma apresentou diferença estatística. Diferentemente, em adultos Million et al. (2011) e (2013) viram que as espécies *B. animalis* e *L. reustri* estão aumentadas dentro dos respectivos gêneros em indivíduos eutróficos e obesos, respectivamente.

Acredita-se que o ganho de peso associado aos *Lactobacillus* se deve especialmente devido a presença da espécie *L. reuteri* que além de estar associado à prevenção da colonização por microrganismos patogênicos, como *Salmonella* Thyphimurium, auxilia na quebra e absorção dos nutrientes pelos enterócitos (MILLION et al., 2012).

Sabe-se que a microbiota intestinal começa a se estabelecer um pouco antes, mas principalmente a partir do nascimento, atingido um clímax de modificações na adolescência quando então passa a ser mais estável na fase adulta. Para investigar quais as principais modificações da microbiota nas principais fases da vida, Mariat e colaboradores (2009) fizeram um estudo comparativo da composição da microbiota com crianças (entre 3 e 10 meses), adultos jovens (entre 25 e 45 anos) e idosos (entre 70 e 90) e verificaram que, os adultos apresentam maior quantidade total de bactérias que as crianças, sendo dominantes os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, enquanto nas crianças espécies de *Bifidobacterium* e *E. coli* são mais abundantes.

Por outro lado, embora a família *Enterobacteriaceae* não tenha sido avaliada, nossos resultados corroboram com o grupo de Mariat uma vez que a maior abundância foi encontrada para *Bacteroidales* seguido por



*Bifidobacterium* spp., indicando proximidade com a composição da microbiota de adultos (Tabela 8).

Diante das diferenças significantes encontradas na quantificação de *Bacteroidales* (maior quantidade em obesos e sobrepeso), *C. perfringens* e *C. difficile* (maior quantidade em eutróficos) foi aplicado o teste de correlação de Spearman a fim de verificar associação destes resultados com a idade e o escore Z, variáveis de maior interesse. Como indicado na Tabela 9, a idade apresentou correlação positiva apenas com *Lactobacillus* spp. ( $rS=0,37$ ;  $p=0,0004$ ); adicionalmente *Lactobacillus* spp. também mostrou correlação positiva para escore Z ( $rS=0,29$ ;  $p=0,008$ ), reforçando a possibilidade de comparação entre os dados de quantificação para este gênero em adultos e crianças acima do peso.

A correlação de Spearman também mostra que houve correlação positiva entre escore Z e *Bacteroidales* e negativa para escore Z e *C. perfringens* (Tabela 9), os quais apresentaram diferenças significantes nas quantificações entre os grupos, mostrando que tais diferenças estão associadas e acompanham o aumento do peso.

Até o presente momento nenhum estudo buscou investigar a influencia do tipo de alimentação nos primeiros seis meses de vida e tipo de parto com a composição da microbiota intestinal de crianças acima dos 3 anos de idade. Kalliomaki et al. (2008) fizeram um estudo para avaliar a microbiota intestinal de bebês de 6 e 12 meses e crianças de 7 anos de idade investigando alterações na sua composição, associado ao ganho de peso e, verificaram que, crianças eutróficas ainda aos 7 anos apresentam maior quantidade de *Bifidobacterium* spp. que aquelas que desenvolveram sobrepeso e/ou obesidade, independente do tipo de amamentação.

Da mesma forma, não foi visto diferenças quanto ao tipo de amamentação em relação à classificação do estado nutricional nas crianças deste trabalho (Tabela 5). Contudo, nas análises de correlação, a associação foi praticamente insignificante entre *Bifidobacterium* spp e escore Z ( $rS = -0,22$ ,  $p = 0,049$ ) o que sugere a não obrigatoriedade entre o número destas bactérias com o aumento do peso (Tabela 9).

Considerando que um ponto relevante sobre o entendimento das relações entre hospedeiro e microbiota intestinal consiste no conceito de que os microrganismos estabelecem relações entre si e que fazem parte de um ecossistema, buscou-se avaliar a existência de associação entre os microrganismos avaliados (Tabela 10). Destaca-se a associação negativa e moderada entre *Bacteroidales* e *C. perfringens* ( $rS=-0,44$ ,  $p=0,0003$ ) cujos os resultados da quantificação além de significantes apontam para a alteração da proporção *Bacteroidetes/Firmicutes* em função do estado nutricional, como relatado na literatura (BACKHED et al., 2004; KARLSOON et al., 2012).

Na tentativa de se compreender o processo de colonização intestinal, diversos pesquisadores voltaram suas análises para o período que compreende desde o nascimento até o primeiro ano de vida. Um estudo interessante realizado na Universidade de Stanford, Califórnia, relata que a microbiota de bebês com semanas de vida difere bastante em sua composição quando comparadas entre si. Neste período, sua constituição é diretamente influenciada pelo tipo de alimentação e tipo de parto. Aos 12 meses de vida o grupo verificou que a distribuição dos microrganismos encontrados nas fezes se assemelha mais àqueles encontrados nas fezes de adultos e puderam estimar que tal composição irá assemelhar-se cada vez mais com os anos (PALMER et al., 2007).

Nas análises da influência das variáveis qualitativas sobre os resultados obtidos no qPCR, independentemente do grupo classificatório, viu-se que a amamentação pode ter influenciado a composição da microbiota em crianças mais velhas, pois em nossos resultados aqueles que mamaram exclusivamente o leite materno apresentaram menor número de *C. difficile* (mediana  $9,4E+02$  contra mediana  $2,2E+02$ ), sendo o mesmo relatado na literatura (BEZIRTZOGLU et al., 1997; MAGNE et al. 2005).

No entanto, alguns resultados foram inesperados, como maior abundância de *C. perfringens* em nascidos de parto normal, quando o esperado seria em parto cesárea (BEZIRTZOGLU et al., 1997). Possivelmente isso pode ser atribuído a modificações sofridas na constituição da microbiota, pois são extremamente individuais e particulares, o que nem

sempre pode ser revelado por estudos utilizando grupos, como sugere Palmer et al. (2007), e pela sua plasticidade não totalmente compreendida.

Finalmente, independente do estado nutricional do indivíduo, estudos sobre a composição da microbiota se mostram extremamente variáveis quanto aos seus resultados. Fatores que são fortes influenciadores disso são: a região geográfica, o tamanho da população investigada, a presença de fatores de confusão (dieta, fumo e idade), diferenças metodológicas e, principalmente, a própria diversidade e individualidade da microbiota. Assim, para melhor compreensão entre a relação da microbiota com o desenvolvimento da obesidade, protocolos de coletas de dados e metodologias devem ser uniformizados na tentativa de minimizar os efeitos dos fatores de confusão.

## 7 CONCLUSÕES

Com os resultados deste trabalho pode-se concluir que:

1. Das amostras fecais avaliadas, as espécies mais isoladas foram *B. vulgatus* e *C. perfringens*; entretanto foi observado que a frequência aumentada de determinadas espécies obtidas em cultivo não é acompanhada do aumento do seu número de células/g de fezes na avaliação quantitativa;
2. Nenhuma cepa de *B. fragilis* foi enterotoxigênica, sendo classificadas como NTBF padrão III e II. Todas as cepas de *C. perfringens* foram toxinotipo A. Foi verificado também a presença dos genes *tpeL* e *netB* nos isolados de *C. perfringens*.
3. A avaliação quantitativa demonstrou maior quantidade de microrganismos pertencentes à ordem *Bacteroidales* e ao gênero *Lactobacillus* nos grupos do sobrepeso e obesos; e Cluster I, *C. perfringens*, *C. difficile* e *Bifidobacterium* spp. no grupo dos eutróficos;
4. Em relação as variáveis qualitativas foi observado que: crianças a partir dos oito anos de idade tendem a adquirir excesso de peso quando comparadas com crianças mais novas; crianças eutróficas apresentam maior quantidade de *Bifidobacterium* spp. independente do tipo de alimentação nos primeiros seis meses de vida e por fim, as diferenças observadas para determinadas espécies, em função do estado nutricional, pode não ser acompanhada por diferenças em seus respectivos gênero, ordem ou agrupamento.

## REFERÊNCIAS\*

- ABILDGAARD, L. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by *netB*-positive and *netB*-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. **Vet. Microbiol.**, v. 144, p. 231-235, 2009.
- ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E. Establishment of the gut microbiota in Western infants. **Acta. Pediatr.**, v. 98, p. 229-238, 2009.
- AJSLEV, T.A. et al. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. **Int. J. Obes.**, v. 35, p. 522-529, 2011.
- ALLEN, S. D., EMERGY, C. L., LYERLY, D. M. *Clostridium*. In: MURRAY, P. R., BARON, E. J., JORGENSEN, J. H., PFALLER, M. A., YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 8<sup>th</sup> ed., Washington: ASM Press., 2003, p. 835-856.
- AMIMOTO, K. et al. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. **Microbiology**, v. 153, p. 1198-1206, 2007.
- BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulate fat storage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 15718-15723, 2004.
- BACKHED, F. Changes in intestinal microflora in obesity: causes or consequence? **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 48, p. 56–57, 2009.
- BAGER, P. et al. Cesarean section and offspring's risk of inflammatory bowel disease: a national cohort study. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 18, p. 857–862, 2010.
- BAJZER, M., SEELEY, R. J. Physiology: obesity and gut flora. **Nature**, v. 44, p. 1009-1010, 2006.
- BARROS, F. C. et al. Cesarean section and risk of obesity in childhood, adolescence and early adulthood: evidence from 3 Brazilian birth cohort. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 95, p. 465–470, 2012.
- BAUMS, C.G. et al. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Vet. Microbiol.**, v. 100, p. 11–16, 2004.
- BERVOETS, L. et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. **Gut Pathog.**, v. 5, p. 10, 2013.

---

\* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BEZIRTZOGLU, E. The intestinal microflora during the first week of life. **Anaerobe**, v. 3, p. 173-177, 1997.

BEZIRTZOGLU, E., STAVROPOULOU, E. Immunology and probiotic impact of the newborn and Young children intestinal microflora. **Anaerobe**, v. 17, p. 369-374, 2011.

BISCHOFF, S. C. 'Gut health': a new objective in medicine? **BMC Med.**, v. 9, p., 1-14, 2011.

BOKORI-BROW, M. et al. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **FEBS J.**, v. 278, p. 4589-4601, 2011.

CARDWELL, C. R. et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. **Diabetologia**, v. 51, p. 726-735, 2008.

CARMAN, R.J. et al., *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. **Anaerobe**, v. 14, p. 102-108, 2008.

CARON, E.; HALL, A. Identification of Two Distinct Mechanisms of Phagocytosis Controlled by Different Rho GTPases. **Science**, v. 282, p. 1717-1721, 1998.

CASTELLANI, A., CHALMERS A. J. **Manual of tropical medicine**. 3<sup>a</sup> ed.; , London: Ballière, Tindall and Cox, 1919. 2436 p.

COLE, T. J. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. **BMJ.**, v. 320, p. 1240-3, 2000.

COLLADO, M.C et al. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 88, p. 894-899, 2008.

COLLINS, M. D. et al. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, p. 812-826, 1994.

CONTERNO, L. et al. Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease? **Genes Nutr.**, v. 6, p. 241-260, 2011.

COURSODON, C. F. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chickens. **Anaerobe**, v. 18, p. 117-121, 2011.

DECKER, E. et al. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. **Pediatrics**, v. 125, p. 1433-1440, 2010.

DiGIULIO, D. B. et al. Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. **PLoS One.**, v. 3, p. e3056, 2005.

DOMINGUEZ, M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 107, p. 11971-11975, 2010.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, p. 1635-1638, 2005.

FALAGAS, M. E., KOMPOTI, E. Obesity and infection. **Lancet Infect. Dis.**, v. 6, p. 438-446, 2006.

FRANCO, A. A. et al. Molecular Evolution of the Pathogenicity Island of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Strains. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 6623-6633, 1999.

FRANCO, A. A. et al. Modulation of bft expression by the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island and its flanking region. **Mol. Microbiol.**, v. 45, p. 1067-1077, 2002.

FUJIMIRA, K. E. et al. Role of the gut microbiota in defining human health. **Expert. Ver. Anti. Infect. Ther.**, v 8, p. 435-454, 2010.

FUNKHOUSER, L. J., BORDENSTEIN, S. R. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. **PLoS Biol.**, v. 11, p. e1001631, 2013.

GOLDENBERG, R. L., HAUTH, J. C., ANDREWS, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 1500-1507, 2000.

GONÇALVES, L. F., CHAIWORAPONGSA, T., ROMERO, R. Intrauterine infection and prematurity. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, v. 8, p.3-13, 2002.

GONSALBES et al. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. **Clin. Exp. Allergy**, v. 43, p. 198-211, 2013.

GUPTA, R. S. The Phylogeny and Signature Sequences Characteristics of *Fibrobacteres*, *Chlorobi*, and *Bacteroidetes*. **Crit. Ver. Microbiol.**, v. 30, p. 123-143, 2004.

HASCOET, J. M. et al. Effect of formula composition on the development of infant gut microbiota. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 52, p. 756-762, 2011.

HOLDMAN, L. V., CATO, E. P., MOORE, W. E. C. **Anaerobe laboratory manual**. 4<sup>th</sup> ed. Blacksburg: Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute, 1977.

HOOPER, L.V., BRY, L., GORDON, J. I. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. **BioEssays**, v. 20, p. 336-343, 1998.

HOYLES, L., McCARTNEY, A. L. What do we mean when refer to *Bacteroidetes* populations in the human gastrointestinal microbiota? **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 299, p. 175–183, 2009.

HUNTER, S. E. et al. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3958–3965, 1993.

JIMENÉZ, E. et al. Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. **Curr. Microbiol.**, v. 51, p. 270-274, 2005.

JIMENÉZ, E. et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Res. Microbiol.**, v. 159, p. 187-193, 2008.

KAIN, J. et al. Trends in overweight and obesity prevalence in Chilean children: comparison of three definitions. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 56, p. 200-204, 2002.

KALLIOMAKI, M. et al. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 87, p. 534-538, 2008.

KANG, S. et al. Dysbiosis of Fecal Microbiota in Crohn's Disease Patients as Revealed by a Custom Phylogenetic Microarray. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 16, p. 2034–2042, 2010.

KANT, A. K., GRAUBARD, B. I. Eating out in America, 1987–2000: trends and nutritional correlates. **Prev. Med.**, v. 38, p. 243-249, 2004.

KARLSSON, C. L. J. et al. The Microbiota of the Gut in Preschool Children with Normal and Excessive Body Weight. **Obesity**, v. 20, p. 2257-2261, 2012.

KEYBURN, A. L. et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 1-11, 2008.

KLAASSENS, E. S. et al. Mixed-species genomic microarray analyses of fecal samples reveal differential transcriptional responses of Bifidobacteria in breast- and formula-fed. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 2668-2676, 2009.



KOENING et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 108, p. 4578-4585, 2011.

KOLPEMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-643, 2000.

KOPLAN, J. P., DIETZ, W. H. Coloric imbalance and public health policy. **JAMA**, v. 282, p. 1579-1581, 1999.

LAPARRA, J. M., SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacol. Res.**, v. 61, p. 219-225, 2010.

LEY, R. E. Obesity and the human microbiome. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 26, p. 5-11, 2010.

LIU, C. et al. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 222, p. 9-16, 2003.

LUDWIG, W., KLENK, H. P. Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. 2<sup>th</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag, 2001. v. 2, p. 498-565.

McCLANE, B. A. et al. The enterotoxic *Clostridia*. In: DOWORKIN, M., FALCOW, S., ROSENBERG, E., SCHELEIFER, K. H., STACKEBRANT, E. **The Prokaryotes**. 3<sup>th</sup> ed. New York, NY, 2006. v 4, p. 698-752.

MAGNE, F. et al. Fecal microbial community in preterm infants. **J. Pedriat. And Nutr.**, v. 41, p. 386-392, 2005.

MARIAT, D. et al. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 123-128, 2009.

MARTÍN, R. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics **Trends Food Sci Tech.**, v. 15, p. 121-127, 2004.

MATOS, S. M. A. et al. Weight gain rate in early childhood and overweight in children 5- 11 years old in Salvador, Bahia State, Brazil. **Cad. Saúde Publica**, v. 27, p. 714-722, 2012.

MELLO, E.D., LUFT, V.C., MEYER, F. Obesidade infantil: como podemos ser eficazes? **J. Pediatr.**, v. 80, p. 173-183, 2004.

MELO, M. E. Diagnóstico da obesidade infantil. <http://www.abeso.org.br/pagina/14/artigos.shtml>. Acesso em 04/02/2014.

- MERINO V. R. et al. Quantitative detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* subtypes isolated from children with and without diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 416-418, 2011.
- MILLION, M. et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. **Int. J. Obes.**, v. 36, p. 817-825, 2012. .
- MILLION, M. 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, p. 1460-1466, 2013.
- MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO E INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Antropometria e Estado Nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro, 2010
- MIRANDA K. R. et al. Enterotoxigenic and nontoxigenic *Bacteroides fragilis* strains isolated in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 734-735, 2008.
- MUSSO, G., GAMBINO, R., CASSADER, M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. **Annu. Rev. Med.**, v. 63, p. 361-380, 2011.
- NADAL, I., et al. Shifts in clostridia bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. **Int. J. Obes.**, v. 33, p. 758-767, 2009.
- NAKANO, V., GOMES, T. A. T, VIEIRA, M. A. M., FERREIRA, R. C., AVILA-CAMPOS, M. J. *bft* gene subtyping in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from children with acute diarrhea. **Anaerobe**, v. 13, p. 1-5, 2007.
- ONIS, M. et al. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bull World Health Organ.**, v. 85, p. 660-667, 2007.
- OLIVEIRA, C.L., FISBERG, M. Obesidade na Infância e Adolescência – Uma Verdadeira Epidemia. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, p. 107-108, 2003
- OLIVEIRA, A.M.A. et al. Sobrepeso e Obesidade Infantil: Influência de Fatores Biológicos e Ambientais em Feira de Santana, BA. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 47: 144-150, 2003.
- PALMER, C. et al. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **PLoS Biol.**, v. 5, p. 1556-1573, 2007.
- PANTOSTI, A. et al. Detection of enteropatogenic *Bacteroides fragilis* by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2482-2486, 1997.

PAREDES-SABJA, D.; SARKER, N.; SARKER, M. R. *Clostridium perfringens tpeL* is expressed during sporulation. **Microb. Pathog.**, v. 51, p. 384-388, 2011.

PONNUSAMY, K. et al. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. **J. Med. Microbiol.**, v. 60, p. 817–827, 2011.

RENZ-POLSTER, H. et al. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. **Clin. Exp. Allergy**, v. 35, p. 1466–1472, 2005.

RIEB, D. et al. Evaluation of a Healthy-Lifestyle Approach to Weight Management. **Prev. Med.**, v. 36, p. 45-54, 2003.

RINTTILA, T. et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97., p. 1166-1177, 2004.

SAAVEDRA, J. M., Dattilo, A. M. Early Development of Intestinal Microbiota: Implications for Future Health. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 41, p. 717-731, 2012.

SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov, comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 56, p. 1599–1605, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>th</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 1-3.

SANTACRUZ, A. et al. Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. **Obesity**, v. 17, p. 1906-1915, 2009.

SANZ, Y. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 94, p. 2000S-2005S, 2011.

SATOKARI et al. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human Placenta. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 48, p. 8-12, 2009.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, v. 18, p. 190-195, 2010.

SCOTT et al. Nutritional influences on the gut microbiota and the consequences for gastrointestinal health. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 39, p. 1073-1078, 2011.

SEPP, E. et al. The association of gut microbiota with body weight and body mass index in preschool children of Estonia. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 24, p. 19231-19236, 2013.

SHEN, J., OBIN, M. S., ZHAO, L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. **Mol. Aspects Med.**; v. 34, p 39-58, 2013.

SHEN, Y. et al. Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection. **Cell Host Microbe**, v. 12, p. 1-12, 2012.

SHERMAN, V. Bariatric Surgery. **Tex. Heart Inst. J.**, v. 40, p. 296-297, 2013.

SIRAGUSA, G. R., WISE, M. G. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 1138–1149, 2007.

TONG, J. et al. M. Application of quantitative real-time PCR for rapid identification of *Bacteroides fragilis* group and related organisms in human wound samples. **Anaerobe.**, v. 17, p. 64-68, 2011.

TURNBAUGH, P.J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027-1031, 2006.

UZAL, F.A., SONGER, J.G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 20, p. 253–265, 2008.

VAEL, C. et al., Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. **Gut Pathog.**, v. 3, p. 8-14, 2011.

XU, P. et al. Correlation of intestinal microbiota with overweight and obesity in Kazakh school children. **BMC Microbiol.**, v. 12, p. 283-288, 2012.

WANG, R. F., CAO, W., CERNIGLIA, C. E. PCR Detection and Quantitation of Predominant Anaerobic Bacteria in Human and Animal Fecal Samples. **App. and Envir. Microbiol.**, v. 4, p. 1242-1247, 1996.

WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, p. 593-621, 2007.

WICK, E. C.;SEARS, C. L. *Bacteroides* spp. and diarrhea. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 23, p. 470-4, 2010.

WIEGEL, J., TANNER, R., RAINEY, R. A. In: DOWORKIN, M., FALCOW, S., ROSENBERG, E., SCHELEIFER, K. H., STACKEBRANT, E. . An Introduction to the Family *Clostridiaceae*. **The Procaryotes**. 3<sup>th</sup> ed., New York: Springer, 2006. v. 4, p. 654-678.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO Expert Committee. **WHO Technical Report Series**, Geneva, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. Methods and development. **WHO (nonserial publication)**. Geneva, Switzerland: WHO 2006, p. 1-316.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Noncommunicable disease: a major health challenge of the 21st century. **World health statistics 2012**.

**ANEXO 1****QUESTIONÁRIO**

Data de nascimento:

Sexo: (....) M (....) F

Qual tipo de parto foi realizado para o nascimento da criança? Cesárea ou natural?

R. \_\_\_\_\_

Durante a gestação a mãe teve aumento excessivo de peso ou diabetes gestacional?

R. \_\_\_\_\_

A criança foi amamentada por aleitamento materno exclusivamente até que idade? Ou foi introduzida fórmula (leite artificial) desde o início?

R. \_\_\_\_\_

A criança recebeu antibiótico nos primeiros 6 meses de idade? Qual foi?

R. \_\_\_\_\_

Qual o peso e o tamanho que a criança nasceu?

R. \_\_\_\_\_

Atualmente, a criança faz uso de medicamentos? Quais?

R. \_\_\_\_\_