

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

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 gastrintestinal 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 eutróficos 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.

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (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 gastrointestinal: 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 (BEZIRTZOGLU, 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 fósforo; 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 (BEZIRTZOGLU, 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.

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 toxintipo 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. Paediatr.**, 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., EMERY, 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**. 8th 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. Paediatr. 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.

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

BEZIRTOGLOU, 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^a 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.

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

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**. 4th 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**. 2th 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**. 3th ed. New York, NY, 2006. v 4, p. 698-752.

MAGNE, F. et al. Fecal microbial community in preterm infants. **J. Pediatr. 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 Pública**, 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 enteropathogenic *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**. 2th 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 Prokarya**. 3th 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**.