

VERENA MACEDO SANTOS

**Avaliação da participação dos micro-organismos da Classe *Mollicutes*  
na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas**

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  
2015

VERENA MACEDO SANTOS

**Avaliação da participação dos micro-organismos da Classe *Mollicutes*  
na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas**

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Versão original

São Paulo  
2015

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

Santos, Verena Macedo.

Avaliação da participação dos micro-organismos da classe Mollicutes na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas / Verena Macedo Santos. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

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

Versão do título para o inglês: Evaluation of Mollicutes microorganism's participation in the gut microbiota of obese and normal weight women.

1. Obesidade 2. Microbiota intestinal 3. Mollicutes 4. qPCR I. Timenetsky, Prof. Dr. Jorge II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0108/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Verena Macedo Santos

Título da Dissertação: Avaliação da participação dos micro-organismos da Classe *Mollicutes* na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas.

Orientador (a): Prof. Dr. Jorge Timenetsky

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, 03 de abril de 2013.

PARECER 1107/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 27.03.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Avaliação da participação dos microrganismos da Classe Mollicutes na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas*" do pesquisador **JORGE TIMENETSKI** e aluna **VERENA MACEDO SANTOS**.

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. conforme modelo constante no [site.icb.usp.br](http://site.icb.usp.br).

*Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.*

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **27.03.2014**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. PAOLO M.A. ZANOTTO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

*“Hoje lembrando-me dela, me vendo nos olhos dela, sei que o  
tinha de ser, se deu. Por que era ela, por que era eu”.*

Chico Buarque

À minha mãe Maria Bernardete, meu anjo de luz. Dedico.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro, sem o qual este estudo não seria realizado.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e todos meus espíritos de luz, em vida e desencarnados, por tudo que me representam, por me permitirem cruzar essa jornada com sabedoria, resignação, fé e discernimento, e por me mostrarem que os “Sinais seguem o que creem”. Ofereço;

À melhor mãe que Deus poderia me permitir nascer, que me mostrou a vida e me ensinou os verdadeiros valores de amor, perdão, caridade, humildade e perseverança, além de me mostrar que as barreiras da vida são transponíveis, e que na verdade devem ser encaradas como fronteiras. Obrigada por continuar olhando por mim e me incentivando, mesmo de outro plano espiritual. Sem o seu amor, tudo isso seria impossível. A ti dedico;

À meu pai Oriston, meu exemplo de vida e companheiro fiel, por entender o meu propósito e me apoiar mesmo nas dificuldades. Você me ensina mais a cada dia sobre a leveza da vida e em como me tornar uma pessoa melhor, uma filha melhor, obrigada;

À meu irmão Breno e minha cunhada Ariela, pelo apoio e por me permitir ser a tia mais feliz e amada desse mundo;

Aos meus sobrinhos queridos, Lulu, Lis e Miguel, por me mostrarem a pureza da vida e do amor em sua essência mais pura;

À Evinha, minha “mãe adotiva” desde os meus 2 dias de vida, por todo amor e dedicação. Minha gratidão será eterna;

Ao professor Jorge Timenetsky, meu querido orientador, por ter aceitado me orientar não só no planejamento e execução do trabalho, mas também na vida. Minha sincera gratidão pela orientação, dedicação e competência profissional;

Ao professor Lucas, meu mentor na vida e no trabalho, pai, mãe, amigo e eterno orientador. Obrigada Marques, por ter acreditado que essa semente um dia iria brotar; Sem o seu apoio e incentivo, eu realmente não conseguiria. Ter você em meu caminho é uma honra e um privilégio;

À Aricelma, um dos maiores presentes que pude receber em minha trajetória, pelo amor, conselhos, carinhos e abraços. Você foi fundamental para eu me manter firme no propósito;

Ao departamento de endocrinologia do HC-FMUSP e aos professores Alfredo Halpern e Marcio Mancinni por abrirem as portas para a realização das coletas e por acreditarem no trabalho;

Aos funcionários do departamento de endocrinologia da HC-FMUSP, sem os quais seria inviável a realização das coletas;

Aos pacientes, por participarem deste estudo e me permitir aprender mais a cada coleta;

Ao professor Djanilson pelo auxílio nas análises estatísticas e por me apresentar Jerusa, um verdadeiro anjo, sem a qual seria inviável as análises de consumo alimentar;

À amiga e companheira de trajetória, Aline Teixeira, pela preciosa colaboração nas análises estatísticas e por ser minha dupla imbatível;

Ao amigo-irmão Filipe Bezerra pela preciosa contribuição nas adaptações das ilustrações e pela honra de sua amizade;

Ao melhor grupo de pesquisa que já sonhei fazer parte, pelos ensinamentos e amizade incondicional. Juntos somos uma família, obrigada meus amigos;

À todos os amigos que passaram pelo aptº 63 ao longo desses anos, vocês foram fundamentais em todos os momentos dessa jornada;

Aos funcionários do ICB II, indispensáveis no meu dia a dia, pelo apoio, amizade, cafés e carinho;

À meus amigos-irmãos e suas respectivas famílias, por me ensinarem que amizade é o sentimento que imanta as almas, suave expressão do ser que necessita intercambiar as forças da emoção sob os estímulos do entendimento fraternal, inspiradora de coragem

e de abnegação, que enflorace as almas, abençoando-as com resistências para as lutas. Amo vocês, gratidão;

À todos que cruzaram meu caminho nesta jornada e que trouxeram consigo ensinamentos que me transformaram em alguém melhor que outrora, o meu muito obrigada.

"Só o conhecimento vivido.  
O conhecimento de dentro para fora.  
Aquele que não é aprendido nos livros nem na fria observação  
do fino repórter de faro infalível.  
Só aquele conhecimento que se viveu dia a dia, minuto a minuto,  
no erro e no acerto (...)  
Possibilita a criação."

*Jorge Amado*

## RESUMO

SANTOS, V. M. **Avaliação da participação dos micro-organismos da Classe *Mollicutes* na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas.** 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A obesidade possui causas multifatoriais, sendo caracterizada como um excesso de gordura corporal acumulada no tecido adiposo causando impactos à saúde. Estudos quanto à interação genética do indivíduo com o ambiente mostram que alguns indivíduos são mais propensos ao ganho de peso do que os outros em ambientes similares. São muitas as evidências de que o metabolismo da microbiota intestinal facilita a extração de calorias da dieta, ajudam a estocá-las no tecido adiposo, além de prover energia e nutrientes para o crescimento microbiano. Nesse contexto, a ocorrência e participação dos *Mollicutes* na microbiota intestinal é praticamente desconhecida, sendo necessários, portanto, o desenvolvimento de estudos que avaliem as implicações e relevância desses microrganismos nas respostas adaptativas da microbiota intestinal humana. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi analisar a participação dos micro-organismos da Classe *Mollicutes* e dos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal de mulheres obesas e eutróficas. Para a realização do estudo, a casuística foi de 20 mulheres diagnosticadas com obesidade (IMC > 30kg/m<sup>2</sup>) e 20 mulheres em eutrofia (IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m<sup>2</sup>). Foram obtidas amostras de fezes, sangue. Foi aplicado um questionário semiestruturado sobre fatores relacionados com obesidade, e possível associação com microbiota intestinal e ambiente, além de avaliação antropométrica através de Bioimpedância, e questionário de frequência alimentar. Desenvolveu-se um ensaio quantitativo por meio de TaqMan PCR para a detecção de *Mollicutes* nas amostras de fezes. A metodologia foi específica, sensível, reprodutível e gerou dados quantitativos para a detecção desses microrganismos nas fezes humanas. Constatou-se no presente estudo que o grupo caso apresentou consumo energético inferior ao recomendado, e que ambos os grupos apresentaram consumo superior de gorduras saturadas e inferior de fibras. Em relação a determinação do estado nutricional os dois grupos se apresentaram acima da média referência, indicando excesso de gordura corporal. Na determinação da microbiota intestinal, constatou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as médias do número dos micro-organismos da classe *Mollicutes* entre os grupos caso e controle. Detectou-se uma associação positiva estatisticamente significativa entre a presença de *Mollicutes* e mulheres obesas (O.R.= 11,5; I.C.= 2,42-55,4). Na quantificação da presença dos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e Bactérias totais na microbiota, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto a sua quantidade entre as mulheres do grupo caso e controle. No entanto, foi observada maior proporção de *Firmicutes/Bacteroidetes* na microbiota intestinal das mulheres obesas em relação às eutróficas do grupo controle. Os resultados obtidos permitiram obter evidências importantes da participação dos micro-organismos da classe *Mollicutes*. As alterações da microbiota intestinal também contribuíram na definição de subconjuntos de indivíduos com diferentes perfis de risco metabólico e a da heterogeneidade associada a fenótipos humanos relacionados com a adiposidade.

**Palavras-chave:** Obesidade. Microbiota intestinal. *Mollicutes*. qPCR.

## ABSTRACT

SANTOS, V. M. **Evaluation of Mollicutes microorganism's participation in the gut microbiota of obese and normal weight women.** 2015. 147 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Obesity has multifactorial causes and it is characterized as an excess of corporal fat accumulated in adipose tissue causing health impacts. Studies on the genetic interaction of the individual with the environment shows that some individuals are more prone to weight gain than others in similar environments. There are many evidences that the gut microbiota metabolism facilitates the harvest of energy derived from ingested nutrients, it help to store them in adipose tissue, and provide energy and nutrients for microbial growth. In this context, the occurrence and participation of *Mollicutes* in the gut microbiota is practically unknown, requiring the development of studies to evaluate the implications and relevance of these microorganisms in the adaptive responses of the human gut microbiota. Thus, the aim of this study was to analyze the participation of the Class *Mollicutes* and *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phylos in the gut microbiota of obese and normal weight women. For the study, it was collected samples of 20 women diagnosed with obesity (BMI > 30 kg / m<sup>2</sup>) and 20 women of normal weight (BMI between 18.5 and 24.9 kg / m<sup>2</sup>), it was collected stool samples, blood, semi-structured questionnaire on etiological factors, predisposing and associated with obesity, and possible association with gut microbiota and the environment, and anthropometric measurements using bioelectrical impedance. A quantitative assay was developed through of TaqMan PCR for the detection of *Mollicutes* in stool samples from patients with the methodology specific, sensitive, reproducible and quantitative for the detection of these microorganisms in human stools. It was found in this study that the case group had a lower energy consumption than recommended, and that both groups had a higher intake of saturated fats and less fiber. For determining the nutritional status of the two groups presented above average reference indicating excess body fat. Regarding the determination of the intestinal microbiota of the study population, there was a statistically significant difference between the mean of microorganisms of *Mollicutes* class between the case and control groups. And it was detected a statistically significant positive association between the presence of *Mollicutes* and obese women (OR = 11.5, CI = 2.42 to 55.4). Regarding the analysis about the participation of phylos *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, and total bacteria in the microbiota of the study population, no statistically significant differences observed for the microbial amount among women of the case and control group. However, there was a higher proportion of *Firmicutes* / *Bacteroidetes* the gut microbiota of obese women compared to the control group normal weight women. Analysis of the results provide important evidence about the participation of almost unknown *Mollicutes* class in the gut microbiota of the population studied, as well as changes and interactions in intestinal microbiota can define subsets of individuals with different metabolic risk profiles and thus contribute to investigation of the heterogeneity associated phenotypes related to adiposity.

**Keywords:** Obesity. Gut microbiota. *Mollicutes*. qPCR.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A –	Adenina
AEA–	<i>N</i> -araquidonoil etanolamina anandamida
AF–	Nível de atividade física
AGCC–	Ácidos graxos de cadeia curta
AgRP–	Peptídeo Relacionado ao Agouti
AIDS–	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AI–	<i>Adequate Intake</i>
AMP–	Adenosina monofosfato
AMPK–	Adenosina proteína quinase
AMPs–	Peptídeos antimicrobianos bacterianos
APC –	Célula apresentadora de antígeno
APRILL–	Ligante indutor de proliferação
atm –	Atmosfera
ATP –	Adenosina tri-fosfato
C –	Citosina
C+G –	Conteúdo citosina e guanina
Cb-1–	Receptores canabinóides
CCK–	Colecistocinina
CH <sub>4</sub> –	Metano
CHOs–	Carboidratos
ChREBP –	Carbohydrate response element-binding protein
CO <sub>2</sub> –	Gás carbônico
CPT1–	Carnitina palmitoil transferase 1
Ct –	<i>Cycle Threshold</i> (Sinal de fluorescência que pode ser detectado)
CV –	Coefficiente de variação
DAG lipase–	sn-1-diacilglicerol lipase seletiva
DCs –	Células Dendríticas
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico

DRI –	<i>Dietary References Intakes</i>
DP –	Desvio padrão
dNTP –	Deoxinucleotídeo trifosfato
EAR –	<i>Estimated Average Requirements</i>
EDTA –	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA –	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EI–	Enzimas citoplasmáticas do sistema PTS
EPI–	Equipamento de Proteção Individual
ERO–	Espécies reativas de oxigênio
FAAH–	Fatty acid amide hydrolase
FABF–	Fator de ativação de células $\beta$
FFAR–	Free fatty acids receptors
FIAF–	Fasting Induced Adipocyte Factor
g –	Gramas
G –	Guanina
GER–	Gasto energético de repouso
GET–	Gasto energético total
GLP-1–	Peptídeo semelhante ao glucagon
GPR–	Receptor acoplado à proteína G
H <sub>2</sub> –	Hidrogênio
HDL–	Lipoproteína de alta densidade
HPR–	Enzimas citoplasmáticas do sistema PTS
IBGE–	Instituto brasileiro de Geografia e Estatística
IC –	Intervalo de Confiança
IECs–	Células epiteliais intestinais)
IFN- $\alpha$ –	Interferon $\alpha$
IFN- $\beta$ –	Interferon $\beta$
IFN- $\gamma$ –	Interferon gama
IgA –	Imunoglobulina A
IL –	Interleucina
IL-10 –	Interleucina 10

IL-1 $\beta$ –	Interleucina 1Beta
IL-25 –	Interleucina 25
IL-33 –	Interleucina 33
IL-6 –	Interleucina 6
IMC –	Índice de massa corporal
IPAQ –	International Physical Activity Questionnaire
kg–	Quilogramas
Kpb –	Kilopares de bases
LPL–	Lipase lipoprotéica
LPS–	Lipopolissacarídeos
MAG–	Monoacilglicerol lipase
MAMPs–	Padrões moleculares associados à micro-organismos
MC4R –	Receptor da Melanocortina 4
MDa –	Megadaltons
mg –	Miligramas
min –	Minuto
mL –	Mililitro
mm –	Milímetro
mM –	Milimolar
mRNA–	RNA mensageiro
MS–	Ministério da Saúde
NAPE-PLD–	<i>N</i> -acil fostatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva
NF-KB–	Fator nuclear Kappa B
NK –	<i>Natural Killers</i>
nm –	Nanômetro
NOD–	Receptores de domínio de digomerização de ligação de nucleotídeos
NPY–	Neuropeptídeo Y
° C –	Graus Celsius
OMS (WHO) –	Organização Mundial de Saúde
OR –	<i>Odds Ratio</i>

pb –	Pares de base
PC1 –	Pró-hormônio Convertase 1
PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase
PGC-1–	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coativador 1 alpha
PGC–	Porcentagem de gordura corporal
pH –	Potencial de hidrogênio iônico
pmol –	Picomol
POF–	Pesquisa dos Orçamentos Familiares
POMC–	Pró-ópio melanocortina
PPAR–	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma
PPI –	Perda de peso intencional
PPLO –	<i>Pleuropneumonia-like Organisms</i>
PTS–	Sistema fosfotransferase
PYY–	Peptídeo tirosina-tirosina
QFA–	Questionário de frequência alimentar
qPCR –	PCR quantitativa ou PCR em tempo real
r <sup>2</sup> –	R da curva
RA –	Ácido retinóico
RCQ–	Relação cintura-quadril
REGIIIβ–	Proteínas antimicrobianas intestinais
REGIIIγ–	Proteínas antimicrobianas intestinais
RNA –	Ácido ribonucléico
rpm –	Rotações por minuto
rRNA –	RNA ribossômico
s –	Segundo
SNC–	Sistema nervoso central
SREBP-1–	Liver sterol response element binding protein type-1
SOCS-1 –	Proteínas supressora da sinalização de citocina-1
SOCS-3 –	Proteínas supressora da sinalização de citocina-3
T –	Timina

TA-	Tecido adiposo
TCLE –	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$ –	Fator de crescimento tumoral- $\beta$
TGI-	Trato gastrintestinal
TLR –	<i>Toll-like receptor</i>
TM-	Tecido muscular
TMB-	Taxa de metabolismo basal
TNF- $\alpha$ –	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg-	Células T regulatórias
tRNA –	RNA transportador
TSLP-	Linfopoiatina estromal tímica
U –	Unidade
UFC –	Unidade Formadora de Colônia
UFC/ $\mu$ L –	Unidade Formadora de Colônia por microlitro
USDA-	<i>United States Department of Agriculture</i>
VET-	Valor energético Total
X –	Vezes
ZO-1-	Zônula de oclusão-1
$\alpha$ –	Alfa
$\beta$ –	Beta
$\chi^2$ –	Teste Qui-quadrado
% –	Por cento
$\mu$ L –	Microlitro
$\mu$ m –	Micrômetros
$\mu$ m/s –	Micrômetros por segundo
2-AG-	2-araquidonoil glicerol

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fatores envolvidos no estabelecimento da microbiota humana ao longo da vida.....	37
<b>Figura 2</b> – Interação funcional entre a microbiota intestinal humana e o sistema imunológico.....	42
<b>Figura 3</b> – Doenças influenciadas pelo metabolismo microbiano intestinal.....	46
<b>Figura 4</b> – Crescimento de <i>M. hominis</i> em meio SP4 com a produção de colônia em forma de “ovo frito” (aumento 40X) .....	55
<b>Figura 5</b> – Comparação entre as médias de consumo de macronutrientes dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI), e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.....	84
<b>Figura 6</b> – Comparação entre as médias de consumo das Vitaminas A, C, E e folato dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI), e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.....	85
<b>Figura 7</b> – Comparação entre as médias de consumo das Vitaminas B1, B2, B6, B12, D, Niacina e Ácido pantotênico dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI),e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.....	86
<b>Figura 8</b> – Comparação entre as médias de consumo de Sais Minerais dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI),e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.....	87
<b>Figura 9</b> – Comparação entre as médias de consumo de Sais Minerais e outros nutrientes dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI),e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.....	87

<b>Figura 10</b> – Curva-padrão gerada a partir dos pontos de Ct obtidos com o gráfico de amplificação de diluições seriadas do controle positivo <i>Mycoplasma hominis</i> calculado pelo software StepOne 2.1 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). São Paulo, SP, 2013-2014.....	90
<b>Figura 11</b> – Quantificação por qPCR, de <i>Mollicutes</i> (UFC/μl) a partir das amostras de fezes, nos grupos caso e controle. São Paulo, SP, 2013-2014.....	92
<b>Figura 12</b> – Quantificação por qPCR, de <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> e <i>Eubacterias</i> (UFC/μl) a partir das amostras de fezes, nos grupos caso e controle. São Paulo, SP, 2013-2014.....	93
<b>Figura 13</b> – Quantificação de IL-1β, IL-10, IL17-A e TNF-α (pg/mL) no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos caso e controle da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.....	96

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Critérios utilizados na estimativa da frequência diária de consumo dos alimentos incluídos no Questionário de Frequência Alimentar .....	61
<b>Quadro 2</b> – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para <i>Mollicutes</i> .....	66
<b>Quadro 3</b> – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> e Bactérias Totais.....	69

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 1: Dados socioeconômicos. São Paulo, SP, 2013-2014.....	72
<b>Tabela 2</b> – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 2: História Familiar. São Paulo, SP, 2013-2014.....	72
<b>Tabela 3</b> – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 3: História Clínica. São Paulo, SP, 2013-2014. ....	73
<b>Tabela 4</b> – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 4: História Obstétrica. São Paulo, SP, 2013-2014.....	74
<b>Tabela 5</b> – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 5: História Ginecológica. São Paulo, SP, 2013-2014. ....	75
<b>Tabela 6</b> – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 6: Consumo atual de tabaco. São Paulo, SP, 2013-2014. ....	75
<b>Tabela 7</b> – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 7: Consumo atual de álcool. São Paulo, SP, 2013-2014.....	76
<b>Tabela 8</b> – Tabela de determinação do perfil da população estudada referente à Seção 8: Atividade Física (IPAQ versão curta). São Paulo, SP, 2013-2014. ....	76
<b>Tabela 9</b> – Tabela de determinação do perfil da população estudada referente à Seção 9: Mudanças recentes nos hábitos alimentares. São Paulo, SP, 2013-2014. ....	77
<b>Tabela 10</b> – Participação dos alimentos nos grupos, médias de consumo por dia dos alimentos consumidos pela população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.....	144
<b>Tabela 11</b> – Definição dos grupos alimentares derivados do Questionário de Frequência Alimentar (QFA) e percentual de consumo da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.....	79
<b>Tabela 12</b> – Análise de consumo de energia e nutrientes da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014. ....	81
<b>Tabela 13</b> – Comparação das variáveis dietéticas relacionadas às razões de ingestão e Valor Energético Total (VET) da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014. ....	83
<b>Tabela 14</b> – Comparação de variáveis antropométricas da população estudada.....	89

<b>Tabela 15</b> – Repetibilidade intra-ensaio e inter-ensaio da qPCR para <i>Mollicutes</i> . São Paulo, SP, 2013-2014. ....	91
<b>Tabela 16</b> – Comparação entre os resultados obtidos no teste de sensibilidade pelas técnicas de PCR convencional e qPCR, para detecção de <i>Mollicutes</i> . São Paulo, SP, 2013-2014.....	91
<b>Tabela 17</b> – Número médio de cópias e percentual dos grupos <i>Mollicutes</i> estudados frente ao Filo Firmicutes na população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014. ....	94
<b>Tabela 18</b> – Número médio de cópias e percentual dos grupos de bacterianos estudados frente às bactérias totais na população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.....	95
<b>Tabela 19</b> – Proporção de <i>Firmicutes</i> em relação à <i>Bacteroidetes</i> na população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.....	95

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Obesidade .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Microbiota Intestinal .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.1 Microbiota intestinal: uma peça chave na saúde e na doença.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.2 Colonização e composição da microbiota intestinal.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.3 Fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal .....</b>	<b>34</b>
2.2.3.1 Fases da vida .....	34
2.2.3.2 Tipo de parto .....	34
2.2.3.3 Tipo de aleitamento.....	35
2.2.3.4 Uso de antibiótico.....	35
2.2.3.5 Dieta .....	36
<b>2.2.4 Microbiota intestinal e a fisiologia do hospedeiro .....</b>	<b>38</b>
2.2.4.1 Nutrição e Metabolismo.....	38
2.2.4.2 Proteção .....	39
2.2.4.2.1 Competição direta de nutrientes .....	39
2.2.4.2.2. Imunomodulação .....	40
2.2.4.3 Função Trófica .....	43
2.2.4.4 Regulação da adiposidade.....	43
<b>2.2.5 Microbiota intestinal e disbiose.....</b>	<b>44</b>
<b>2.2.6 Microbiota Intestinal e obesidade.....</b>	<b>47</b>
<b>2.2.7 Mecanismos pelos quais a microbiota intestinal contribui para a obesidade.....</b>	<b>49</b>
2.2.7.1 Extração de energia adicional da dieta.....	49
2.2.7.2 Indução da inflamação por meio da alteração da permeabilidade intestinal.....	51
<b>2.3 MOLLICUTES .....</b>	<b>52</b>
<b>2.3.1 Características Gerais dos Mollicutes.....</b>	<b>52</b>

<b>2.3.2 Mollicutes, Microbiota Intestinal e Obesidade</b> .....	56
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>58</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	58
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	58
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1 Protocolo do estudo</b> .....	59
<b>4.2 Casuística</b> .....	59
<b>4.3 Delineamento experimental</b> .....	60
<b>4.4 Determinação do estado nutricional</b> .....	60
4.4.1 Avaliação qualitativa do consumo alimentar .....	60
4.4.2 Avaliação antropométrica do estado nutricional .....	62
4.4.2.1 Análise da Composição Corporal pelo Método de Bioimpedância .....	63
<b>4.5 Coleta das amostras clínicas</b> .....	64
<b>4.6 Determinação da microbiota intestinal</b> .....	<b>65</b>
4.6.1 Padronização de reação de PCR quantitativo (qPCR) por meio de TaqMan para a detecção de Mollicutes.....	65
4.6.1.1 Cepas bacterianas e condições de cultura .....	65
4.6.1.2 Desenvolvimento de primers e sonda para a detecção de Mollicutes pela PCR quantitativa.....	65
4.6.1.3 PCR quantitativa .....	66
4.6.1.4 Especificidade da qPCR e repetibilidade intra e inter-ensaios .....	67
4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional .....	68
4.6.3 Detecção de micro-organismos dos filos Firmicutes e Bacteroidetes e bactérias totais (Eubacterias) por PCR em tempo Real (qPCR) .....	68
<b>4.7 Dosagem de citocinas do soro sanguíneo</b> .....	69
<b>4.8 Análises Estatísticas</b> .....	70
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
<b>5.1 Perfil da população estudada</b> .....	71
<b>5.2 Determinação do estado nutricional</b> .....	78

5.2.1 Avaliação qualitativa do consumo alimentar .....	78
5.2.2 Avaliação antropométrica do estado nutricional .....	88
<b>5.3 Determinação da microbiota intestinal .....</b>	<b>90</b>
5.3.1 Padronização de reação de PCR quantitativo (qPCR) por meio de TaqMan para a detecção de Mollicutes.....	90
5.3.2 Detecção de micro-organismos dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, além de bactérias totais (Eubacterias) por PCR em tempo Real (qPCR).....	93
<b>5.4 Dosagem de citocinas do soro sanguíneo.....</b>	<b>96</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>108</b>
<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>127</b>
<b>APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO .....</b>	<b>131</b>
<b>APÊNDICE C- TABELA 10.....</b>	<b>143</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) como o excesso de gordura corporal acumulada no tecido adiposo com implicações para a saúde. Algumas estimativas globais recentes indicam que em 2013, mais de 600 milhões da população mundial adulta (com 18 anos ou mais) eram obesos com 11% dos homens e 15% das mulheres (MARIE, 2014). No Brasil, em 2014 estimou-se que na população adulta (20 anos ou mais), 10,5 milhões são obesos com 12,4% dos homens e 16,9% das mulheres (IBGE, 2014). Nesse contexto, atualmente a obesidade está entre os maiores problemas de saúde pública e distúrbio da nutrição. A obesidade é considerada atualmente uma epidemia (BACON; APHRAMOR, 2011; OLSHANSKY et al, 2005;). As alterações nos padrões dietéticos e nutricionais da população brasileira têm sido analisadas no processo da transição nutricional (KAC; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2003).

Neste processo, verificou-se que ocorreu inversão nos padrões de distribuição das alterações nutricionais. A alta incidência de sobrepeso e obesidade na população implica no aumento da ocorrência de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes mellitus e hipertensão arterial (AMUNA; ZOTOR, 2008; ARAI et al., 2009; DUNCAN et al., 1993; GIGANTE et al, 1997; JIRTLE; SKINNER, 2007; KAC; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2003; LESSA, 1998; MONDINI; MONTEIRO, 1998; POPKIN et al, 2006). Na obesidade, ocorre basicamente o balanço energético positivo cuja patogênese não está completamente elucidada, estando associada a fatores comportamentais, culturais e biológicos. A regulação do balanço energético e do estoque de energia corporal são influenciados pela susceptibilidade individual e seu contexto social e econômico, demográfico, cultural, educacional, ambiental e familiar, além de fatores hormonais e de herança genética (GORAN, 2000; VEIGA; SICHIERI, 2006).

O mapa gênico da obesidade humana está constantemente em mudança pela identificação de novos genes e regiões cromossômicas associadas com a obesidade. As alterações do comportamento alimentar e os hábitos sedentários indicam ser os principais fatores de interferência nos genes de susceptibilidade a obesidade e conseqüentemente no aumento da obesidade mundial. É provável,

portanto, que a obesidade ocorra como a resultante de fatores poligênicos complexos e um ambiente obesogênico (dieta e sedentarismo) (BAJZER; SEELEY, 2006; BOUCHARD, 2000; CANI et al., 2007; DERAM; VILLARES, 2009; DUNCAN et al., 2008; TURNBAUGH et al., 2009).

A captação de energia pode justificar em parte o metabolismo de alguns pacientes obesos que não apresentam ingestão alimentar excessiva, sugerindo que a microbiota intestinal pode predispor o indivíduo à obesidade (BACKHED, 2004). Alguns estudos têm demonstrado que o desenvolvimento da obesidade em humanos pode ser determinado pelas proporções relativas de dois filos principais de bactérias da microbiota intestinal humana, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, que diferem consideravelmente entre indivíduos eutróficos e obesos (DUNCAN et al., 2008; LEY et al., 2005, 2006; TENNYSON; FRIEDMAN, 2008). Estudos comparativos mostraram que ratos obesos possuem significativamente níveis mais baixos de micro-organismos do Filo *Bacteroidetes* e níveis mais elevados de *Firmicutes*. Este último, está associado com um aumento de absorção de energia da dieta (BACKHED, 2004; CANI; DELZENNE, 2009; DIBASE et al., 2012; LEY et al, 2005; RAOULT, 2008; TURNBAUGH et al, 2006). Turnbaugh et al (2008) obtiveram resultados semelhantes em ratos com obesidade induzida por dieta. Curiosamente, embora as alterações nos níveis de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram observadas nos camundongos obesos por dieta induzida, a diferença foi relacionada principalmente as bactérias da classe dos *Mollicutes*.

As espécies do Filo *Bacteroidetes* pertencem à microbiota intestinal humana e animal. Estas bactérias são bacilos ou cocobacilos gram-negativos, anaeróbios obrigatórios, heterotróficos, mesófilos, sacarolíticos, não formadores de esporos, imóveis. São resistentes à bile, não produzem pigmentos. Têm como principais produtos finais do metabolismo da glicose, os ácidos succínico e acético (JOHANSSON; PETTERSON, 2002; MANILOFF, 2002). O Filo *Firmicutes*, encontrado em maior proporção no trato gastrointestinal humano, são micro-organismos Gram positivos na maioria. Na classificação atual o filo divide-se tipicamente em três classes: *Bacilli* - aeróbios facultativos ou obrigatórios; *Clostridia* - organismos anaeróbios; e *Erysipelotrichia*. *Mollicutes* é a única classe do filo *Tenericutes*, anteriormente classificada dentro do filo *Firmicutes* (BERGEY's, 2009, 2010; LUDWIG; KLENK, 2001; RAZIN et al., 1998).

Os estudos das interações de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* na microbiota intestinal, e sua associação com a obesidade, têm aumentado. No entanto, a participação dos *Mollicutes* é praticamente desconhecida. O gênero *Mycoplasma*, foi introduzido em 1929 para designar micro-organismos, atualmente classificados como membros da família *Mycoplasmataceae*, ordem *Mycoplasmatales*, da classe dos *Mollicutes*. (Mollis = mole; cútis = pele) (RAZIN, 1992). Os *Mollicutes* possuem um genoma pequeno, sendo que algumas espécies apresentam o menor genoma entre os procariotos e, em consequência, apresentam metabolismo reduzido (MILES; NICHOLAS, 1998; NEIMARK, 1986; RAZIN; TULLY, 1983). Distinguem-se de outros procariotos pela simplicidade celular, genoma e metabolismo reduzido. A ausência natural da parede celular confere resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Incluem-se as sulfas e rimfapicina respectivamente pela ausência da síntese de ácido fólico e possuir uma polimerase diferente. Com aproximadamente 200 espécies, estes micro-organismos infectam humanos, animais, insetos e plantas. Considerados em geral, como oportunistas por excelência, colonizam “preferencialmente” a superfície de mucosas de mamíferos, mas têm potencial de causar infecções sistêmicas dependendo do hospedeiro. (DYBVIG, 1990; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Obesidade*

A prevalência da obesidade tem crescido rapidamente e representa um dos principais desafios de saúde pública neste século. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem em decorrência da obesidade ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ). A prevalência mundial quase duplicou entre 1980 e 2008, com uma transição de 5% dos homens e 8% das mulheres em 1980, para 10% dos homens e 14% das mulheres (WHO, 2014). A obesidade pode ser definida como o grau de armazenamento de gordura no organismo associada ao ganho excessivo de peso corporal total. É, portanto, considerada uma doença crônica, podendo acarretar em consequências para a saúde, devido às suas relações com diversas complicações metabólicas (MS, 2006).

A pesquisa dos Orçamentos Familiares (POF; IBGE, 2010) nos últimos seis anos indicou que a frequência de pessoas com excesso de peso aumentou em mais de um ponto percentual ao ano. Desta maneira, em dez anos, o excesso de peso poderia alcançar dois terços da população adulta do Brasil, magnitude idêntica à encontrada na população dos Estados Unidos. Estimativas de inquéritos nacionais e internacionais das últimas décadas indicam que a obesidade em 2025, alcance 40% da população nos EUA, 30%, na Inglaterra, e 20%, no Brasil (HU, 2008).

O excesso de peso e a obesidade na população expressam essencialmente o desequilíbrio entre ingestão e utilização de calorias. A justificativa está na mudança dos padrões de alimentação e de atividade física. Em 2002-2003, revelou-se tendência crescente de substituição de alimentos básicos e tradicionais na dieta brasileira (como arroz, feijão e hortaliças) por bebidas e alimentos industrializados (como refrigerantes, biscoitos, carnes processadas e comida pronta). Caracteriza-se, portanto, o aumento na densidade energética das refeições e padrões de alimentação capazes de comprometer a auto-regulação do balanço energético dos indivíduos e aumentar o risco de obesidade (LEVY-COSTA et al., 2005).

Além disto, em consequência à obesidade tem sido observado aumento considerável da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes mellitus e hipertensão arterial. Pelo longo tempo

de evolução destas doenças ocorrem lesões irreversíveis de intensidade variada resultando no aumento de incapacidade ou óbito vêm ocupando um maior espaço no perfil de morbimortalidade de populações latino americanas (DUNCAN et al., 1993; LESSA, 1998). Em importante estudo, entre 1958 e 1951, envolvendo cinco mil indivíduos de 35 a 75 anos por período de até 44 anos a obesidade ( $IMC > 30\text{Kg/m}^2$ ) foi independentemente associada ao maior risco para hipertensão (mulheres:  $RR=2,6$ ,  $IC95\%$  2,2-3,1), diabetes tipo 2 (mulheres:  $RR=1,4$   $IC95\%$  1-1,8) e doença cardiovascular mulheres:  $RR=1,4$ ,  $IC95\%$  1,1-1,7) (WILSON et al., 2002). Os ganhos na diminuição das taxas de tabagismo ao longo do século XX e as expectativas no aumento de tempo de vida podem ser neutralizadas pelas perspectivas do aumento da obesidade (STEWART et al., 2009). Especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil, o custo anual para o Sistema Único de Saúde, para atender as doenças relacionadas ao sobrepeso é estimado em US\$ 20.152.102.171 (BAHIA et al., 2012).

O ganho de peso, ocorre pela menor utilização de gordura como fonte de energia do que oxidar carboidratos elevando o coeficiente respiratório, obtido através da razão entre a produção de gás carbônico, resultante da oxidação de carboidratos, e o consumo de oxigênio determinado através de calorimetria (MARRA et al, 2004). Seis lesões monogênicas principais produzem desordens endócrinas que resultam na obesidade: Deficiência congênita de Leptina, defeitos no receptor de Leptina, deficiência no pró-hormônio convertase 1(PC1), deficiência em pró-ópio-melanocortina (POMC), defeitos no receptor da Melanocortina 4 (MC4R) e defeitos no Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR). O controle da ingestão alimentar, a curto prazo, é controlado principalmente por vias de sinalização que emanam do trato gastrintestinal, incluindo o peptídeo orexigênico, grelina, que ativa os sinais de fome, e os peptídeos anorexigênicos colecistoquinina (CCK), peptídeo similar ao glucagon 1- glucagon-like peptide 1 (GLP-1), e peptídeo tirosina-tirosina (PYY) que geram sinais de saciedade. Para o controle da ingestão à longo prazo, parecem ser primordiais os sinais que emanam a partir do tecido adiposo (leptina) e pâncreas (insulina) liberados em resposta à ingestão de alimentos e depósitos de gordura corporal (KONTUREK et al., 2004).

Tem sido amplamente documentado na literatura o reganho de peso sucessivo às dietas, pois, sabe-se que cerca de um a dois terços do peso perdido

tendem a ser recuperados no ano seguinte, sendo a recuperação quase total ao final de cinco anos (GOODRICK et al., 1996). A partir disso, tem sido questionado o efeito das dietas restritivas sobre a biologia humana e sua contribuição para tornar a obesidade uma condição que possivelmente se autoperpetua e se agrava de maneira progressiva. Diversos trabalhos mostram que a ciclagem de peso (ou "efeito sanfona") pode aumentar a suscetibilidade para o ganho de massa corporal no futuro (KORKEILA et al., 1999; NEUMARK-SZTAINER et al., 2006, 2007).

## **2.2 Microbiota Intestinal**

### **2.2.1 Microbiota intestinal: uma peça chave na saúde e na doença**

Nas décadas passadas, acreditava-se que todos os micro-organismos da microbiota possuíam potencial de causar infecções. O estudo da interação entre micro-organismos e o desenvolvimento de enfermidades é um tema crescente na justificativa de certas doenças (DETHLEFSEN et al., 2007). O termo microbiota refere-se ao conjunto de micro-organismos no hospedeiro sadio e o termo microbioma, é o conjunto de genes microbianos (BACKHED, 2004; LANGA, 2006; VRIEZE, 2010). O estudo da diversidade e distribuição da microbiota e sua interação com hospedeiro tem contribuído na justificativa de algumas doenças (LEY et al., 2008; VENTURA et al., 2008). A microbiota do trato gastrointestinal humano é o ecossistema mais complexo, constituído por diversas espécies de micro-organismos. As bactérias constituem o grupo com maior diversidade e abundância. Assim como o genoma de cada indivíduo é uma impressão digital, a composição da microbiota intestinal também parece ser (LEY et al., 2006; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; SMIDT; DE VOS, 2007; XU; GORDON, 2003).

O comensalismo e a simbiose bacteriana refletem uma "corrida dinâmica", que se inicia no encontro da bactéria com o hospedeiro vulnerável e prossegue com respostas adaptativas entre os dois organismos. Em alguns casos, a coevolução atenua a virulência e conduz a uma coexistência pacífica com ou sem franca codependência. Em outras circunstâncias, a relação patogênica é mantida por meio da superação dos mecanismos de defesas inatas ou adaptativas do hospedeiro pelas bactérias (GORDON; HOOPER, 2001). Estima-se que a microbiota intestinal é composta por mais de 1000 espécies bacterianas. O número de células microbianas

no lúmen intestinal é de 10 vezes maior que as células eucarióticas do organismo, representando em torno de 1 kg de peso corporal (SCARPELLINI, 2010). Além disso, o microbioma é 100 vezes maior que o genoma humano, podendo-se assim, considerar a microbiota intestinal como um órgão virtual exteriorizado, metabolicamente adaptável e flexível, além de rapidamente renovável, o que contribui para metabolismo e desempenha importante papel na obtenção de energia da dieta (FRANÇOIS-PIERRE, 2009).

A microbiota intestinal é crucial para a vida humana com impacto na fisiologia e na nutrição do hospedeiro (HATTORI; TAYLOR, 2008). Considera-se que humanos são “superorganismos”, com metabolismo mediado pelos atributos humanos e microbianos (GILL et al., 2006). O conceito de “superorganismo” representa importante mudança de paradigma no entendimento da biologia humana e pode ter impacto expressivo na prevenção e na terapia de doenças no futuro (NICHOLSON, 2006).

### **2.2.2 Colonização e composição da microbiota intestinal**

O trato gastrointestinal fetal é considerado praticamente estéril. No nascimento é rapidamente colonizado por micro-organismos da mãe e do ambiente hospitalar (PALMER et al., 2007). Sugere-se que de três a quatro semanas após o nascimento, a microbiota intestinal começa a se estabilizar, aumentando gradualmente a sua complexidade. Após um ano, assemelha-se à microbiota de um adulto (MACKIE et al., 1999; PALMER et al., 2007; SCHÉLE et al., 2013). Contrapondo-se à percepção da ausência de micro-organismos no feto, demonstrou-se a presença de DNA bacteriano na placenta e no cordão umbilical (JIMÉNEZ et al., 2005; SATOKARI et al., 2009). Além disso, a identificação de algumas bactérias no mecônio explica a origem dos primeiros micro-organismos colonizadores do intestino, antes mesmo do nascimento, possivelmente como um mecanismo adaptativo para o desenvolvimento do intestino fetal fora do organismo materno (JIMÉNEZ et al., 2008).

Os micro-organismos presentes no trato gastrointestinal podem ser autóctones ou alóctones. Linhagens autóctones têm longa associação com o hospedeiro e formam uma população estável de tamanho característico em uma região do intestino. Os organismos alóctones são adquiridos principalmente através dos alimentos ingeridos e do ecossistema oral. É difícil determinar se um organismo é

um autóctone verdadeiro. Contudo, as bactérias alóctones não persistem no ecossistema e são detectáveis apenas por um período limitado (GORDON; HOOPER, 2001; LEY et al., 2006; WALTER, 2008).

Os micro-organismos são encontrados em todo o trato gastrintestinal, no entanto, as mudanças nas condições fisiológicas implicam diferenças na composição de micro-organismos nos diversos locais. No trato gastrintestinal inferior, o fluxo do conteúdo torna-se mais lento e o ambiente contém menos substâncias antimicrobianas, favorecendo a colonização microbiana e o estabelecimento de maior densidade de micro-organismos (QIN et al., 2010; ZOETENDAL et al., 2006). A partir da cavidade oral ao ânus, tem sido observado o aumento da densidade microbiana no jejuno/ íleo e no intestino grosso, em comparação com o estômago e duodeno. O cólon refere-se a um ecossistema complexo, com ampla diversidade microbiana e presença de diversos gêneros bacterianos. O pH neutro e a abundância relativa de nutrientes, como os carboidratos não digeríveis e outros componentes alimentares que escapam do processo digestivo, tornam o cólon um ambiente favorável à proliferação microbiana. O cólon é a região do TGI que apresenta maior densidade microbiana, podendo alcançar  $10^{14}$ UFC.g<sup>-1</sup>. Dados tem mostrado que cada indivíduo carrega mais de 1000 filotipos, que representam mais de 7000 linhagens (AZAD et al., 2013; ECKBURG et al., 2005; FRANK et al., 2007; HOLZAPFEL, 2006; KLEEREBEZEM; VAUGHAN, 2009; LEY et al., 2008; QUIGLEY, 2013; ZOETENDAL et al., 2006).

Aproximadamente 99% dos genes identificados por metagenoma do intestino humano são bacterianos. Na maioria dos indivíduos, cerca de 90% dos filos são *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, seguidos por *Actinobacterias* (família *Bifidobacteriaceae*) e *Proteobacterias* (família *Enterobacteriaceae*). O filo mais abundante, refere-se ao *Firmicutes*, apresentando como principais integrantes as classes *Bacilli*, *Clostridia* e *Mollicutes*; e dos *Bacteroidetes* as classes *Bacteroides*, *Flavobacteria* e *Sphingobacterias*. Os filos *Actinobacterias* e *Proteobacterias* se apresentam em menor proporção (ARUMUGAM et al., 2011; DE FILIPPO et al., 2010; HUTTENHOWER et al., 2012; QIN et al., 2010; QUIGLEY, 2013; VILLANUEVA-MILLÁN et al., 2015; VRIEZE, 2010; ZOETENDAL et al., 2006).

### **2.2.3 Fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal**

A microbiota do TGI humano é uma comunidade complexa, cuja composição é inconstante, diferindo inter e intra-individualmente, definida por uma série de fatores como genética do hospedeiro, alimentação, sucessão bacteriana, função imune e estado de saúde (LEY et al., 2008; EVERARD et al., 2011; 2014).

#### *2.2.3.1 Fases da vida*

A diversidade bacteriana no intestino infantil é inicialmente muito baixa até os dois anos ao contrário da microbiota de adulto (GAREAU et al., 2010; HAJELA et al., 2015). A baixa diversidade de bactérias na primeira infância inibe a maturação regular da microbiota intestinal e maturação tardia da mucosa do sistema imunológico, implicando em riscos do aumento da resposta imune, assim como doenças alérgicas. Neste contexto envolve o desenvolvimento da tolerância oral e a susceptibilidade da criança a alergias e inflamação. A microbiota sofre, portanto, mudanças substanciais nos extremos da vida, essas ramificações ainda estão sendo exploradas (AURELI et al., 2011; HAJELA et al., 2015; SHERIDAN et al., 2014; SMITH et al., 2013).

#### *2.2.3.2 Tipo de parto*

A microbiota materna é uma fonte de micro-organismos para a colonização do TGI do recém-nascido. As bactérias residentes no canal vaginal e na região perineal também ganham acesso ao TGI de recém-nascidos (BRY et al., 1996; MACKIE et al., 1999). Ocorrem diferenças entre o microbioma de um bebê recém-nascido por parto normal em comparação ao bebê recém-nascido por parto cesárea. No parto vaginal o bebê é colonizado por bactérias vaginais e fecais maternas, cujas composição microbiana reflete a microbiota intestinal materna composta predominantemente pelos gêneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* e *Sneathia*. As amostras fecais de bebês nascidos de parto cesariana apresentaram gêneros típicos de microbiota da pele e do ambiente hospitalar, predominantemente *Staphylococcus* e *C. difficile*. Estes bebês também apresentaram níveis significativamente mais baixos de *Bifidobacterium* e diversidade bacteriana menor do que os bebês nascidos por parto normal. Estas diferenças podem justificar o aumento do risco de doenças específicas em bebês recém-nascidos por parto

cesariana à longo prazo (AZAD, et al., 2013; BELLO et al., 2010; COLLADO et al., 2012; DOMINGUEZ- PENDERS et al., 2006; PRINCE et al., 2014).

As diferenças no processo de colonização intestinal decorrentes do tipo de parto poderiam refletir-se no desenvolvimento do sistema imunológico, visto que os micro-organismos gastrintestinais influenciam esse processo por meio do envio de importantes sinais regulatórios necessários para o desenvolvimento da adequada tolerância ao ambiente (BIASUCCI et al., 2008; CARDWELL et al., 2008; DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010; KOENIG et al., 2011; MORELLI et al., 2008; RENZ-POLSTER et al., 2005).

#### 2.2.3.3 Tipo de aleitamento

O leite materno humano é considerado um dos principais fatores da iniciação e no desenvolvimento da microbiota do neonato, uma vez que contém substratos (prebióticos) para estimular o crescimento bacteriano e também é fonte de micro-organismos. Estima-se que o consumo de 800 ml de leite materno por dia proporcione  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  micro-organismos comensais durante a amamentação (MARTÍN et al., 2004). Desta maneira, a contagem de *Bifidobacterium* aumenta drasticamente. *Lactobacillus* e *Bacteroides* aumentam em menor proporção e enterobactérias e enterococos diminuem. Espécies de *Bifidobacterium* correspondem de 80% a 90% do total dos componentes da microbiota fecal infantil presentes em bebês amamentados por leite materno. Já em recém-nascidos alimentados com fórmulas infantis, a microbiota tem demonstrado ser muito mais complexa, sendo composta por *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Streptococcus* (ADLERBERTH; WOLD, 2009; CUMMINS; THOMPSON, 1997; DE SANTA BARBARA et al., 2003; DONOVAN; ODIE, 1994; DONOVAN, 2006; MACKIE et al., 1999; MARQUES et al., 2010; MCCRACKEN; LORENZ, 2001; PALMER, 2011; POROYKO et al., 2010).

#### 2.2.3.4 Uso de antibiótico

A eventual antibioticoterapia interfere também no equilíbrio da microbiota. A disbiose (alteração da microbiota) depende de fatores como espectro de ação da droga; idade e dieta do indivíduo; dosagem e duração do tratamento; via de administração; propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas além de grau de

resistência da comunidade (LEY, 2000; SULLIVAN et al., 2001). A seleção de bactérias resistentes a drogas pela antibioticoterapia é um problema mundial. Os genes de resistência passam para diversos gêneros bacterianos no intestino. A aquisição de genes de resistência confere benefícios a determinada espécie bacteriana diante da pressão seletiva exercida pelo antibiótico. Quando essa pressão seletiva é suspensa, a cepa resistente apresenta menor desempenho em comparação com a espécie susceptível. No entanto, esse clone menos competitivo pode compensar essa perda de desempenho pela aquisição de mutações compensatórias (JERNBERG et al., 2010). No intestino, os antibióticos, além de selecionarem bactérias resistentes, também aumentam o número de transferências do *pool* de genes de células resistentes (DETHJESEN et al., 2008; KARAMI et al., 2007; YANG et al., 2009).

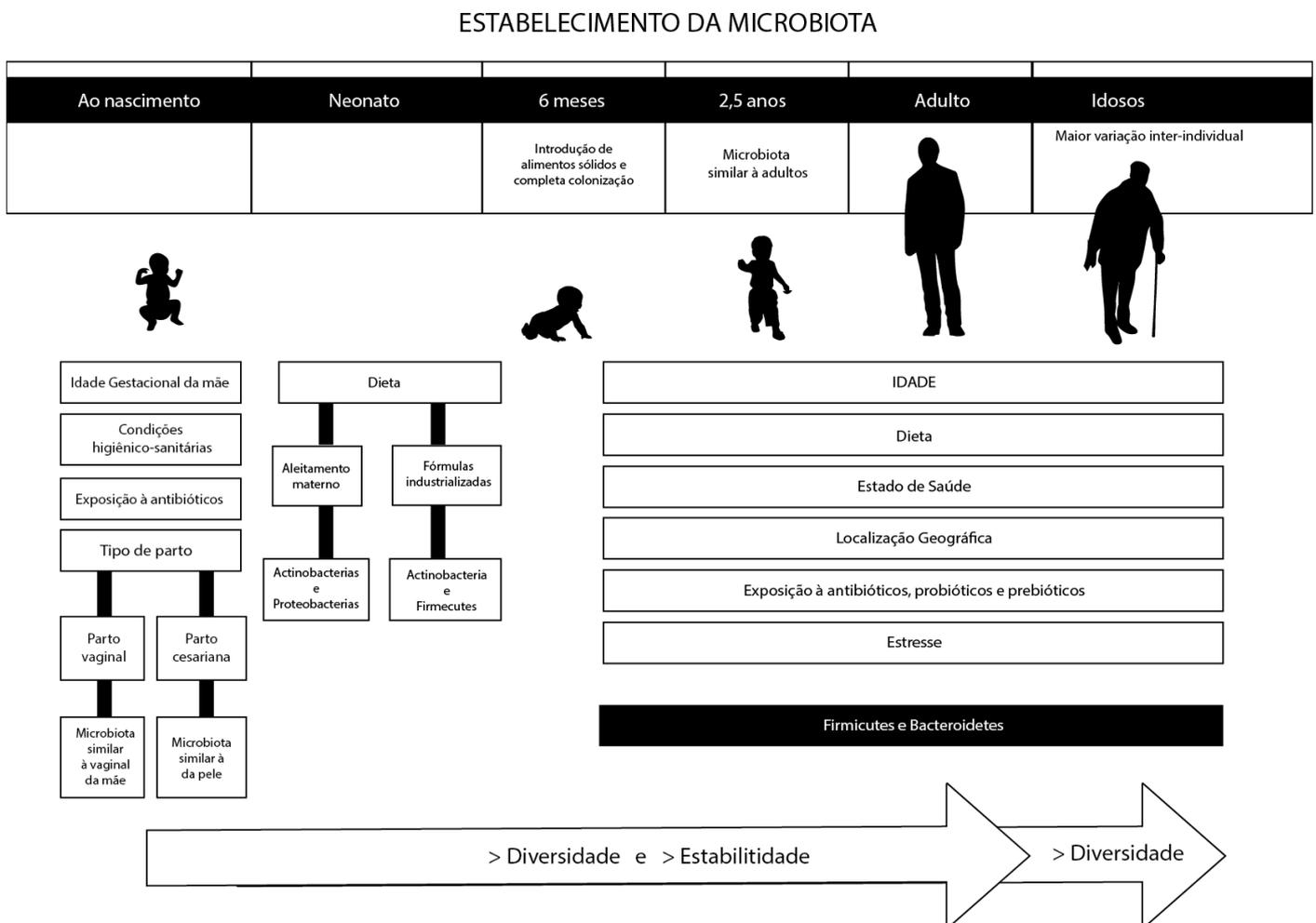
#### 2.2.3.5 Dieta

Muitos estudos tem sido realizados no intuito de compreender a relação entre o consumo alimentar e a composição da microbiota intestinal, principalmente no sentido de uma dieta ocidentalizada baseada em alimentos ricos em carboidratos simples, lipídios e proteínas de origem animal, sal e poucos alimentos *in natura*, como frutas e hortaliças ao comparar se com a dietas dos nossos antepassados, caracterizada pelo consumo de grandes quantidades de amido, fibras e polissacáridos vegetais, além de pequenas quantidades de gordura e proteína animal. Em modelos murinos de obesidade induzida por padrão de dieta ocidental, no qual animais geneticamente idênticos que herdaram microbiotas semelhantes, a relação entre dieta e representantes microbianos é dinâmica e ajustável, impactando a capacidade da microbiota de promover a adiposidade no hospedeiro (CARMODY et al., 2015; DAVID et al., 2014; DE FILIPPO et al., 2010; FLEISSNER et al., 2010; HILDEBRANDT et al., 2009; LEY et al., 2008; MENDONÇA; ANJOS, 2004; WALKER et al, 2011; WONG et al., 2012; WU et al., 2011).

Uma vez que a microbiota foi estabelecida nestes primeiros anos, observa-se um aumento na composição microbiana, tanto na diversidade quanto na riqueza, atingindo a mais alta complexidade em adultos, com várias centenas de filotipos e níveis de espécie. Cada indivíduo humano atinge um clímax de composição homeostático, o que provavelmente permanece relativamente estável durante a

maior parte da vida de um adulto saudável. Nas fases tardias da vida, a composição da microbiota torna-se novamente menos diversificada e mais dinâmica, caracterizada por uma maior proporção de *Bacteroidetes* para *Firmicutes*, aumento de *Proteobacteria*, e diminuição da *Bifidobacterium* (MACKIE, 1999; OTTMAN et al., 2012; RAUTAVA et al., 2012; VILLANUEVA-MILLÁN et al., 2015) (Figura 1).

**Figura 1** – Fatores envolvidos no estabelecimento da microbiota humana ao longo da vida



Adaptado de M.J. Villanueva-Millán et al., 2015.

### **2.2.4 Microbiota intestinal e a fisiologia do hospedeiro**

O intestino representa a interface natural entre microbiota intestinal e o hospedeiro, sendo a mucosa intestinal, a localização principal para a interação de micro-organismos e antígenos com o hospedeiro, por meio de intenso *cross-talk* (KINROSS et al., 2011). Os achados de estudos clínicos e experimentais têm evidenciado que a interação microbiota/hospedeiro pode influenciar favoravelmente a saúde do hospedeiro de diversas maneiras. Até agora, as principais funções conhecidas da microbiota podem ser classificadas em quatro grupos: metabólica (nutrição e digestão), proteção (proteção contra agentes patogênicos, imunomodulação), trófica (controle da proliferação de células epiteliais e diferenciação) e regulação da adiposidade.

#### **2.2.4.1 Nutrição e Metabolismo**

A microbiota intestinal é um importante fator que afeta a extração de energia a partir da dieta e do armazenamento de energia no hospedeiro. A fim de realizar estas funções, as enzimas metabólicas da microbiota intestinal como as glicosidases e polissacaridases têm a capacidade de extrair energia a partir de nutrientes inacessíveis, uma vez que estas enzimas são capazes de clivar ligações glicosídicas presentes em alguns polissacarídeos de plantas e fibras dietéticas (BACKHED et al., 2004, 2005; GUARNER; MALAGELADA, 2003). Os polissacarídeos não digeríveis, como a oligofrutose (inulina), são metabolizados pela microbiota colônica em oligossacarídeos e monossacarídeos e então fermentados a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), particularmente acetato, propionato e butirato. Estes AGCC são rapidamente absorvidos. O Butirato fornece energia para o metabolismo celular, enquanto acetato e propionato seguem para a corrente sanguínea, sendo transportados para o fígado e órgãos periféricos, onde podem atuar como substratos para a gliconeogênese e lipogênese (SHEN et al., 2013; ZAIBI et al., 2010).

A microbiota intestinal também induz a expressão do peptídeo YY (PYY) anorexigênico, que geram sinais de saciedade, através de um mecanismo dependente do receptor GPR41. Assim, a produção de AGCC pela microbiota intestinal está associada com um aumento na saciedade e uma redução na ingestão de alimentos no hospedeiro, o qual, por sua vez, controla o ganho de peso corporal (CLUNY et al., 2015; SHEN et al., 2013; ZAIBI et al., 2010). Outros mecanismos

pelos quais as bactérias do intestino podem influenciar metabolismo do colesterol são induzidos através de *Fasting Induced Adipocyte Factor* (FIAF) que é seletivamente suprimida no epitélio intestinal pela microbiota intestinal (MARTINEZ et al., 2009).

Também tem sido relatado o envolvimento da microbiota intestinal na metabolização de polifenóis que contribuem para o seu potencial antioxidante e ações benéficas, além de síntese de algumas vitaminas, como B12 e K, além da indução da expressão do receptor de vitamina D pelos AGCC, aumentando a sua absorção e regulando o metabolismo do cálcio (BRENCHLEY; DOUEK, 2012; GUARNER; MALAGELADA, 2003; KIM et al., 1998; MANACH; DONOVAN, 2004; RESTA, 2009; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Finalmente, a microbiota intestinal também é capaz de executar uma série de biotransformações em xenobióticos, como drogas e seus metabólitos, em formas que podem afetar sua absorção e biodisponibilidade (WILSON; NICHOLSON, 2009). Neste contexto, tem sido demonstrado que a microbiota intestinal metaboliza tóxicos e compostos potencialmente cancerígenos, tais como pirolisatos (BRENCHLEY; DOUEK, 2012).

#### 2.2.4.2 Proteção

Tem sido observado, que a ausência da microbiota intestinal torna o organismo suscetível à infecção. Alguns dos mecanismos envolvidos nessas ações protetoras incluem competição direta de nutrientes limitados e a modulação de respostas imunológicas no hospedeiro (GUARNER; MALAGELADA, 2003; KAMADA et al., 2013; SEKIROV et al., 2010).

##### 2.2.4.2.1 Competição direta de nutrientes

Vários mecanismos têm sido implicados na resistência à colonização do trato gastrointestinal por patógenos. A camada de muco intestinal é capaz de manter mutualismos mantendo as bactérias no compartimento e restringindo estimulação imunológica ostensiva. O hospedeiro fornece ativamente os nutrientes que a microbiota precisa, e a microbiota indica a quantidade de nutrientes que são necessários para o hospedeiro. Esta relação impede superprodução indesejada do nutriente, o que favoreceria a intrusão de micro-organismos competitivos com potencial de patogenicidade. Finalmente, as bactérias podem inibir o crescimento

dos seus concorrentes, produzindo peptídeos antimicrobianos ou proteínas conhecidas como bacteriocinas que são sintetizadas em ribossomos (GUARNER; MALAGELADA, 2003; MONTALTO et al., 2009; PURCHIARONI et al., 2013; SEKIROV et al., 2010).

#### 2.2.4.2.2. Imunomodulação

As interações entre micro-organismos e células epiteliais e imunes baseiam-se no reconhecimento de padrões moleculares associados à micro-organismos (MAMPs), sendo mediado por receptores de reconhecimento padrão, representados pelos receptores do tipo toll (TLR) encontrados na superfície de células epiteliais e imunes e pelos receptores de domínio de digomerização de ligação de nucleotídeos (NOD), que se encontram no citoplasma. Esses receptores desempenham um importante papel na gênese e na modulação da resposta inflamatória (FRANCHI et al., 2009; MARANDUBA et al., 2014; MONTALTO et al., 2009; PURCHIARONI et al., 2013).

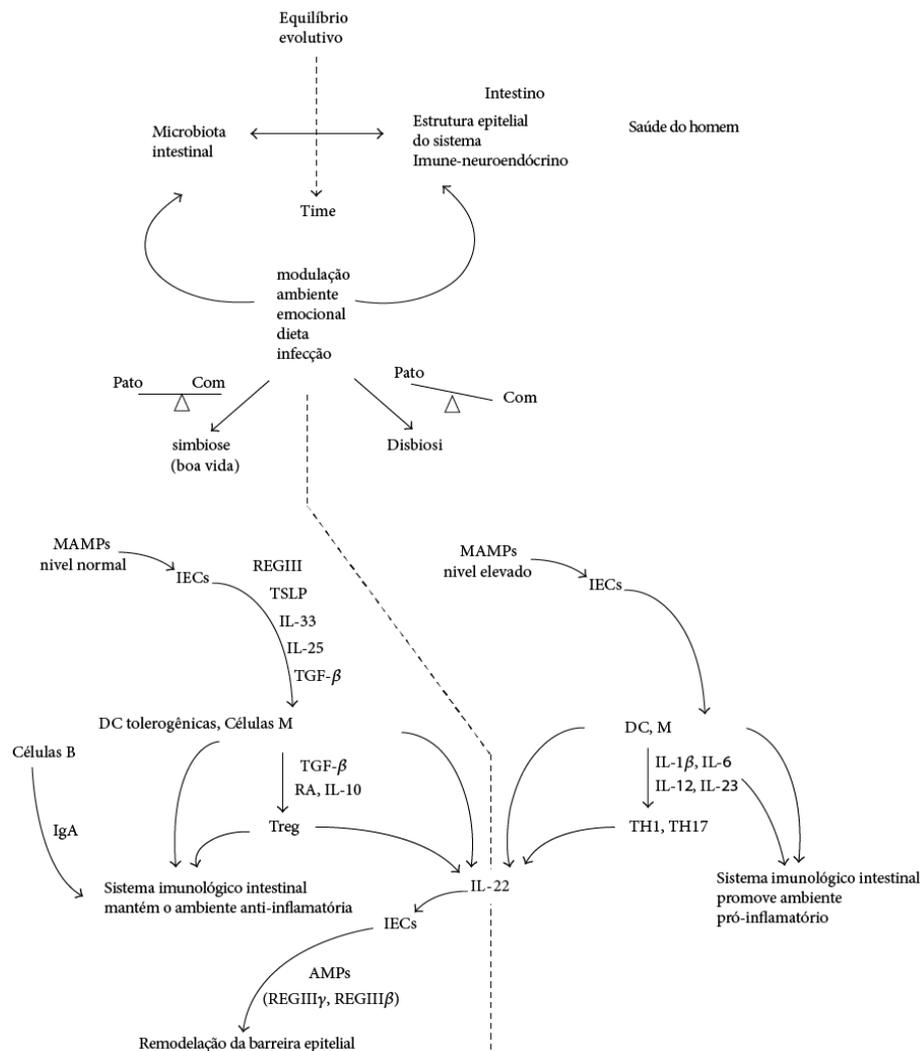
A interação funcional entre microbiota intestinal e sistema imunológico inicia-se com a promoção de um ambiente anti-inflamatório pelas bactérias (Figura 2). Em um contexto simbiótico, MAMPs estimulam continuamente através das IECs (células epiteliais intestinais) a secreção das proteínas antimicrobianas intestinais, REGIII $\gamma$ , para o lúmen, além de linfopoietina estromal tímica (TSLP), IL-33, IL-25, e o fator de crescimento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), sob o epitélio. Esses mediadores imunológicos induzem o desenvolvimento de macrófagos tolerogênicos e células dendríticas (DCs) tolerogênicas (KAMADA et al., 2013; MAYNARD et al., 2012).

Células Dendríticas (DCs) tolerogênicas produzem TGF- $\beta$  e ácido retinóico (RA), que estimulam o desenvolvimento de Células T regulatórias (*Treg*). Assim, através das células *Treg* (que utilizam diversos mecanismos de regulação), macrófagos (que produzem IL-10), e DCs tolerogênicos, o sistema imunológico intestinal é capaz de estabelecer e manter um ambiente anti-inflamatório. Além dos papéis reguladores essenciais de TGF- $\beta$ , esta citocina tem sido associada com outras substâncias derivadas do epitélio, tais como fator de ativação de células  $\beta$  (FABF) e ligante indutor de proliferação (APRILL), com o intuito de induzir o desenvolvimento de células produtoras de IgA (plasmócitos) (FAGARASAN et al., 2010). Esta imunoglobulina é capaz de prevenir a ligação de bactérias comensais no

epitélio do hospedeiro estando, portanto, envolvida na formação da microbiota intestinal (MACPHERSON et al., 2012).

Além disto, tem sido relatada que a produção de alguns tipos de peptídeos antimicrobianos bacterianos (AMPs), como a secreção das proteínas antimicrobianas intestinais, REGIII $\gamma$ , REGIII $\beta$  e angiogenina-4, é influenciada pela micro-organismos comensais via TLR / MyD88 (FRANCHI et al., 2009; GOTO; IVANOV, 2013; VAN VLIET et al., 2010). Desse modo, verifica-se que no intestino humano saudável a microbiota promove constante exposição de ligantes aos TLR, garantindo a ativação basal contínua de vias de sinalização, resultando em inflamação fisiológica de baixa intensidade. Além disso, micro-organismos comensais também são capazes de suprimir respostas inflamatórias intensas (VAN VLIET et al., 2010).

**Figura 2** – Interação funcional entre a microbiota intestinal humana e o sistema imunológico.



**Legenda** – O equilíbrio evolutivo é formado ao longo do tempo, sendo modulado por pressão ambiental. A microbiota intestinal e o ambiente intestinal são desenvolvidas em conjunto, sendo necessário para o benefício de ambos, tolerar um ao outro. O sistema imunológico monitora essa interação garantindo a homeostase e contribuindo para a simbiose. No entanto, o desequilíbrio causado na presença de disbiose pode causar a reação do sistema imunológico. Simbiose e disbiose dependem de equilíbrio entre bactérias comensais e patogênicas. Bactérias comensais promovem um ambiente anti-inflamatório. Em um contexto de simbiose, MAMPs estimulam continuamente as IECs a secretarem moléculas que atuam protegendo o epitélio e produzindo um ambiente tolerogênico. Em disbiose, há uma liberação significativa de MAMPs que podem induzir IECs, DCs ativadas e macrófagos a secretar citocinas inflamatórias. Consequentemente, há um desenvolvimento de efetores imunológicos. IL-22 é produzida em ambas as situações, mas a contribuição para a remodelação da barreira epitelial é controlada por regulação imune. M: macrófago; Com: bactérias comensais; Pato: bactérias patogênicas.

Adaptado de MARANDUBA et al., 2014.

#### 2.2.4.3 Função Trófica

A microbiota intestinal desempenha funções tróficas, modulando a proliferação e diferenciação de células epiteliais do cólon através dos AGCC produzidos na fermentação de hidratos de carbono não digeríveis. Neste contexto, o butirato é considerado o AGCC com maior efeito, pois promove o crescimento e o *turnover* das células epiteliais, acelerando a maturação intestinal da mucosa durante o seu desenvolvimento ou para induzir seu reparo após uma lesão. O butirato é capaz de aumentar proliferação, diferenciação e maturação além de reduzir apoptose de enterócitos normais no intestino delgado através de sua influência sobre a expressão de genes e a síntese de proteínas (GUILLOTEAU et al., 2010; HAMER et al., 2008).

O butirato parece exercer um efeito trófico em células epiteliais do íleo e do jejuno através de um mecanismo de neuro-hormonal, sugerindo um efeito indireto. No cólon, a ausência de butirato induziu apoptose massiva nos colonócitos, podendo ser explicado pelo fato de que o butirato é a fonte principal de energia para estas células além de estimular a liberação de péptidos gastrointestinais e/ou fatores de crescimento que desempenham um papel fundamental na proliferação celular (GUILLOTEAU et al., 2010; HAMER et al., 2008).

#### 2.2.4.4 Regulação da adiposidade

Tem sido evidenciado que a microbiota intestinal influencia a adiposidade do hospedeiro. A primeira evidência do papel da microbiota intestinal na regulação da homeostase energética e adiposidade do hospedeiro foi demonstrada por Backhed et al. (2004), em estudo que foi demonstrado que ratos *germ-free* apresentavam menor conteúdo de gordura corporal do que ratos convencionais, mesmo ao consumirem a mesma quantidade de alimentos. Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a relação entre microbiota intestinal e a adiposidade. Assim, dependendo da sua composição, a microbiota pode aumentar a extração energética da dieta a partir de polissacarídeos não digeríveis, com menor conteúdo de energia disponível nas fezes, além de maiores níveis de AGCC no intestino. Propõe-se, ainda, que a microbiota intestinal seja capaz de induzir a regulação de genes do hospedeiro, que modulam o metabolismo energético (MUSSO et al., 2011).

### **2.2.5 Microbiota intestinal e disbiose**

Em condições saudáveis, existe um equilíbrio entre todos os micro-organismos presentes no intestino, estando as bactérias benéficas, em maior quantidade (eubiose). Entretanto, pode ocorrer desequilíbrio na microbiota com consequente predomínio das bactérias potencialmente patogênicas sobre as benéficas. Esse desequilíbrio é definido como disbiose e pode comprometer a saúde do hospedeiro, uma vez que se associa à patogênese de várias doenças (HAWRELAK; MYERS, 2004).

O uso de antibióticos, anti-inflamatórios hormonais e não hormonais; abuso de laxantes; consumo excessivo de alimentos processados, baixo consumo de alimentos crus; excessiva exposição a toxinas ambientais incluindo alguns metais pesados; doenças consumptivas, como câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS); disfunções hepatopancreáticas; estresse; divertículos; idade; tempo de trânsito e pH intestinal; disponibilidade de material fermentável; estado imunológico do hospedeiro e infecções são fatores importantes para promover alteração da microbiota acarretando em disbiose intestinal e consequentemente modificando várias funções do TGI incluindo a digestão, a biodisponibilidade/absorção, eliminação, desintoxicação e função imunológica (ALMEIDA et al., 2009; HAWRELA; MYERS, 2004; SEARS; GENUIS, 2012).

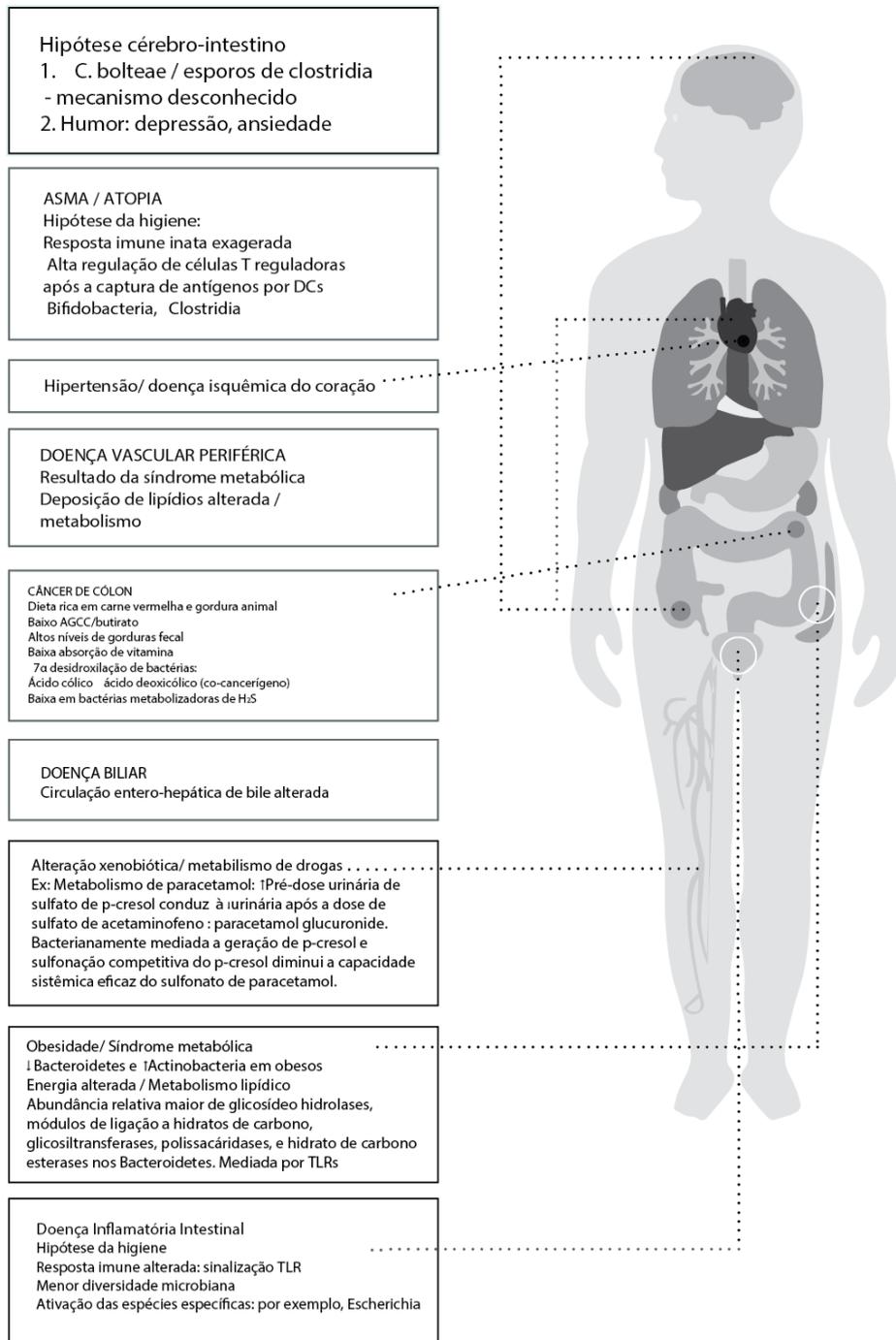
Em um contexto de disbiose (Figura 2), a presença de agentes patogênicos pode perturbar a regulação do ambiente anti-inflamatório. Quando patógenos entéricos superam as bactérias comensais, o desequilíbrio entre comensais e bactérias patogênicas provoca uma liberação significativa de MAMPs. Este aumento pode induzir IECs, DCs e macrófagos ativados, a secretar citocinas inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, e IL-23. Estas citocinas estimulam o desenvolvimento de células CD4+, T auxiliares (T helper - TH1) e células TH17 (produzem IL-17A, IL-17F, e IL-22), resultando na inflamação crônica (MAYNARD et al., 2012).

Na vigência da disbiose intestinal, pode ocorrer perda de funções importantes da microbiota do hospedeiro. As alterações qualitativas e quantitativas na microbiota intestinal, além das alterações nas atividades metabólicas e na distribuição dos micro-organismos ao longo do intestino, associam-se a diversas condições, tais como: diarreias, déficits nutricionais, doença celíaca, câncer colorretal, doenças

inflamatórias intestinais, síndrome do cólon irritável e supercrescimento bacteriano (ALMEIDA et al., 2009; HAWRELAK; MYERS, 2004).

A disbiose pode provocar aumento da permeabilidade intestinal, alterando uma importante função da mucosa intestinal que é a atividade de barreira. Assim, moléculas antigênicas ou tóxicas e micro-organismos nocivos podem se translocar através da barreira, promovendo a passagem destas substâncias através da mucosa epitelial para o sangue ou sistema linfático gerando uma resposta inflamatória sistêmica. A ligação entre disbiose e desenvolvimento de doenças como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares vem sendo explorada. A obesidade representa uma das doenças mais estudadas associadas à perturbações na microbiota intestinal, no entanto requer mais estudos (Figura 3) (ALMEIDA et al., 2009; HAWRELAK; MYERS, 2004; KINROSS et al., 2011).

**Figura 3 – Doenças influenciadas pelo metabolismo microbiano intestinal.**



**Legenda –** A variedade de doenças sistêmicas que são diretamente influenciadas pelo metabolismo da microbiota intestinal e a sua influência sobre outras vias em mamíferos, tais como o sistema imunitário inato, tem sido demonstradas. Especificamente em destaque incluem as vias metabólicas envolvidas com o metabolismo de drogas e a obesidade, que são diretamente influenciados pelo teor microbiano intestinal. Ags: antigénios; *C. bolteae*: *Clostridium Bolteae*; DCs: células dendríticas; AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; TLR: receptor Toll-like.

Adaptado de Kinross et al., 2011.

### **2.2.6 Microbiota Intestinal e obesidade**

A partir de 2004, mais um fator ambiental passou a ser apontado como importante para o controle do peso e da homeostase energética: a microbiota intestinal. As primeiras evidências da relação microbiota intestinal *versus* obesidade foram constatadas em animais *germ-free* convencionalizados. Esses animais demonstraram, que mesmo ao consumir uma menor quantidade de dieta e, portanto, menos calorias em comparação aos animais *germ-free*, apresentaram aumento da quantidade de gordura corporal (BACKHED et al., 2004).

Especificamente, tem-se observado que a microbiota de ratos obesos tem uma maior capacidade de extração de energia da dieta, e esta característica pode ser transmissível através da colonização de ratos *germ-free* com a microbiota fecal de doadores obesos, resultando em um aumento significativamente maior no percentual de gordura corporal total, com o intuito de armazenar os lipídeos produzidos. Estes estudos demonstraram que microbiota intestinal é um potencial fator de contribuição adicional à fisiopatologia da obesidade (BACKHED et al., 2004; HARRIS et al., 2012; LEY et al., 2005; TURNBAUGH et al., 2006).

A definição da alteração na composição da microbiota intestinal de obesos ainda permanece controversa na literatura, tanto no que se refere à abordagem em nível de filo quanto de espécies em humanos (LYRA et al., 2010). Além destes estudos realizados com animais *germ-free*, outros observaram associações importantes entre obesidade e mudanças na composição da microbiota intestinal tal como uma diversidade bacteriana reduzida (no filo e/ou outros níveis) e/ou representação alterada de genes e vias metabólicas bacterianas (DE LA SERRE et al., 2010; LEY et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2006).

Em geral, vários autores têm demonstrado associações entre obesidade e mudanças na abundância relativa dos dois filos bacterianos dominantes, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Mais especificamente, um aumento do filo *Firmicutes* e uma diminuição do filo *Bacteroidetes* em modelos de ratos obesos e pacientes têm sido observado. Além disso, indivíduos magros e pessoas que perderam peso apresentaram maior abundância do filo *Bacteroidetes* (ABDALLAH et al., 2011; BACKHED et al., 2007; CANI et al., 2008; LEY et al., 2005, 2006; TURNBAUGH et al., 2006, VERDAM et al., 2013).

O aumento da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* em ratos obesos pode estar associada com possíveis mediações de respostas adaptativas pelo hospedeiro para limitar a absorção e armazenamento de energia e/ou para promover a adiposidade (LEY et al., 2005). Embora os resultados dos estudos demonstrem diferenças na proporção de grupos bacterianos entre indivíduos eutróficos e obesos, ainda não se sabe se algum grupo de micro-organismos em especial contribui de maneira direta para o desenvolvimento da obesidade e de alterações metabólicas. Associações entre tipos de bactéria e as variáveis metabólicas têm sido observadas, seja em humanos ou em modelo animal, indicando que a modulação de determinados grupos bacterianos possa exercer efeito no contexto da obesidade. Os desafios enfrentados agora se referem ao entendimento dos mecanismos pelos quais grupos bacterianos influenciam parâmetros metabólicos e se intervenções dietéticas ou medicamentosas utilizadas para modular a proporção desses grupos bacterianos podem melhorar o perfil metabólico ou ao contrário, agravá-lo (TURNBAUGH et al., 2009).

Em relação à composição da microbiota intestinal seguida à perda de peso, de acordo com estudos de coorte, a proporção de *Bacteroidetes* aumentou enquanto o número de *Firmicutes* diminuiu, parecendo restaurar a relação *Firmicutes/Bacteroides* que estava inicialmente aumentada em indivíduos obesos. Na verdade, após 10 semanas de restrição energética e de exercício, os participantes que perderam mais de quatro quilogramas (kg) de peso corporal mostraram um aumento significativo na população de Grupo *B. fragilis*, bem como um aumento na proporção *Bacteroides/Prevotella* positivamente correlacionada com a perda de peso (HARRIS et al., 2012; NADAL et al., 2009; SANTACRUZ et al., 2009).

No que se diz respeito aos efeitos do exercício físico na microbiota intestinal, Evans et al. (2014) demonstraram que o exercício teve efeitos significativos tanto em camundongos eutróficos, quanto em camundongos obesos que ingeriam dieta rica em gordura sobre o equilíbrio relativo dos principais filos bacterianos, juntamente com a prevenção de obesidade e normalização da tolerância à glicose induzida por dieta. De fato, a distância percorrida é proporcional à diminuição observada para a razão *Firmicutes/Bacteroides* (EVANS et al., 2014). Também é importante ressaltar que o exercício aumentou significativamente a proporção relativa de bactérias

produtoras de butirato tais como Bacteroidales S24-7, que estão associados com a saúde da célula epitelial intestinal. Além disso, o exercício físico aumentou a diversidade da microbiota intestinal apenas em ratinhos alimentados com uma dieta rica em gordura. No entanto, sugere-se que o exercício pode agir de forma independente da microbiota intestinal, aumentando a utilização de energia, apesar de um consumo de uma dieta rica em gordura.

### **2.2.7 Mecanismos pelos quais a microbiota intestinal contribui para a obesidade**

#### **2.2.7.1 Extração de energia adicional da dieta**

A noção de que a microbiota intestinal fornece energia para o hospedeiro é suportada por achados em ratos *germ-free* não naturalmente colonizados com micro-organismos, que apresentaram um menor ganho de peso quando alimentados com uma dieta rica em gordura do que os ratos *germ-free* controles (BACKHED et al., 2007; CAESAR et al., 2012; DING et al., 2010; TREMAROLI; BACKHED, 2012). Esses resultados evidenciam que na ausência da microbiota, o consumo de uma dieta obesogênica parece não estimular o desenvolvimento da obesidade. A Microbiota intestinal pode afetar ambos os lados da equação do balanço energético, não apenas como um fator que influencia a colheita de energia a partir de componentes da dieta, mas também como um fator que afeta genes do hospedeiro que regulam o gasto de energia e/ou de armazenamento (BACKHED et al., 2004; GILL et al., 2006; WOLEVER et al., 1991).

A fermentação de polissacarídeos pela microbiota pode gerar um aumento no fluxo de monossacarídeos para o fígado e adipócitos, favorecendo a lipogênese *de novo*, através da ativação da expressão de dois reguladores nucleares de enzimas lipogênicas- *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) e *liver sterol response element binding protein type-1* (SREBP-1) - os quais ativam as enzimas lipogênicas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase. (BACKHED et al., 2004; MUSSO et al., 2011; TSUKUMO et al., 2009). Nesse contexto, o menor acúmulo de gordura corporal demonstrado em animais *germ-free*, que consumiram dieta hiperlipídica e apresentaram absorção semelhante aos animais convencionalizados, indica que a microbiota pode exercer efeito sobre o fluxo de lipídios entre os tecidos, reduzindo o acúmulo de gordura (BACKHED et al., 2007).

A proteína *Fasting Induced Adipose Factor* (FIAF) é suprimida pela presença de microbiota, sendo um inibidor da lipase lipoprotéica (LPL), produzido pelo intestino, fígado e tecido adiposo, limitando a captação de ácidos graxos e favorecendo o acúmulo de triacilgliceróis nesse tecido. Tem sido demonstrado que animais *germ-free* apresentaram uma maior expressão de FIAF e fenótipo resistente à obesidade (BACKHED et al., 2004, 2005, 2007). A participação de FIAF no metabolismo lipídico foi reforçada através de estudos com ratos *germ-free*, que diferiram apenas na expressão dessa proteína (FIAF <sup>+/+</sup> versus FIAF <sup>-/-</sup>), onde verificou-se que a deficiência dessa proteína induzida geneticamente não é um fator protetor para animais *germ-free* contra o ganho de peso promovido pela dieta hiperlipídica (BACKHED et al., 2007).

Além de promover a lipogênese (através das enzimas lipogênicas e inibição da FIAF), a microbiota também desempenha um papel importante no gasto de energia obtida a partir da dieta. Mais especificamente, a microbiota de obesos parece favorecer uma inibição de oxidação de ácidos graxos (que, por sua vez, favorecem a deposição e armazenamento de lipídios no tecido adiposo, fígado e/ou tecido muscular) por mecanismos complementares, mas independentes (HARDIE; SAKAMOTO, 2006; PUIGSERVER; SPIEGELMAN, 2003; RABOT et al., 2010).

A microbiota também pode influenciar a homeostase energética por meio da sinalização exercida pelos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os AGCC agem não apenas como fonte de energia, mas também como moléculas de sinalização através de receptores acoplados à proteína G (GPRs). GPRs são um grupo de receptores transmembrânicos intestinais que respondem aos ácidos graxos. Entre os receptores dessa família, os receptores Gpr41 e Gpr43 são fundamentais, sendo expressos abundantemente no intestino delgado distal, no cólon e nos adipócitos. Essa ligação resulta na ativação desses receptores, induzindo a secreção de polipeptídeo YY (PYY) e leptina, hormônios que influenciam nas funções intestinais e na regulação do apetite. (BELLAHCENE et al., 2013; BINDELS et al., 2013; HARDIE; SAKAMOTO, 2006; INOUE et al., 2014; MUSSO et al., 2011; ZAIBI et al., 2010).

### 2.2.7.2 *Indução da inflamação por meio da alteração da permeabilidade intestinal*

As concentrações sanguíneas de lipopolissacarídeos (LPS) sofrem significativa influência da microbiota intestinal. Principalmente as bactérias Gram-negativas apresentam em sua superfície celular os LPS que funcionam como antígenos, estimulando a resposta imune do hospedeiro. Assim, a microbiota intestinal representa um grande reservatório dessa endotoxina, especialmente naqueles indivíduos que habitualmente consomem dieta com alto teor de gorduras (HOTAMISLIGIL, 2010).

A principal via de sinalização do LPS envolve o fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B). O LPS pode aumentar os níveis circulantes de resistina, espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteínas supressoras da sinalização de citocinas-1 e 3 (SOCS-1 e SOCS-3). A elevação de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- $\alpha$ ), TNF-  $\alpha$ , interleucina (IL)-6 e IL-1 $\beta$ , geralmente observada em pacientes obesos, pode ser originada de macrófagos no tecido adiposo ou da interação do LPS com seu receptor. O aumento dessas citocinas pode contribuir para a translocação de LPS, favorecendo a ocorrência de endotoxemia metabólica, e, conseqüentemente, potencializar a inflamação subclínica, por meio da redução da expressão/distribuição de proteínas formadoras de junções oclusivas (*tight junctions*), como zônula de oclusão-1 (ZO-1) e ocludina, aumentando a permeabilidade intestinal. (CANI et al., 2008; LAM et al., 2012).

Além da redução da expressão das junções oclusivas intestinais, há também uma evidência de que a microbiota intestinal pode regular a permeabilidade intestinal através do sistema endocanabinóide. Em um estudo realizado por Muccioli et al. (2010), a modulação da composição microbiana do intestino, seja por colonização em ratos *germ-free* ou por tratamento com antibióticos, reduziu a expressão dos receptores canabinóides (Cb-1) tanto do cólon, quanto do tecido adiposo, enquanto em animais alimentados com uma dieta rica em gordura foi observado aumento da expressão Cb1. (EVERARD et al., 2013; GEURTS et al., 2011; MUCCIOLI et al., 2010).

## 2.3 MOLLICUTES

### 2.3.1 Características Gerais dos Mollicutes

Os micoplasmas foram primeiramente isolados por Norcard e Roux em 1898, que estudavam a Pleuropneumonia Bovina, doença descrita há mais de um século na Europa e na África. Em seguida, micro-organismos semelhantes, isolados de humanos e de animais, foram descritos por outros pesquisadores e denominados de PPLO – “Pleuropneumonia-Like Organisms” (MOROWITZ, 2002; RAZIN; JACOBS, 1992).

O termo “micoplasma” foi usado para denominar os micro-organismos da Classe *Mollicutes* (*Mollis* = mole; *cútis* = pele), mas sugeriu-se o uso do termo genérico mollicutes como nome trivial, para designar qualquer microrganismo desta classe. O termo micoplasma aplica-se apenas aos membros do gênero *Mycoplasma*. Recentemente algumas riquetsias e outras bactérias, de taxonomia indefinida, foram incluídas aos *Mollicutes*. A classe é composta por quatro ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*), sete famílias (*Mycoplasmataceae*, *Incertae sedis* (ordem *Mycoplasmatales*), *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Incertae sedis* (ordem *Acholeplasmatales*) e *Anaeroplasmataceae*), 11 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Phytoplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*) e mais de 200 espécies. A família *Mycoplasmataceae* contém os principais micro-organismos de interesse médico, dentre os quais estão os gêneros *Mycoplasma*. Os mollicutes compreendem aproximadamente 200 espécies distribuídas ente plantas, insetos, animais e humanos (BERGEY's, 2010; RAZIN, 1992; RAZIN; YOGEV ; NAOT, 1998).

*Mollicutes* é a única classe do filo *Tenericutes*, sendo, anteriormente classificado dentro do filo *Firmicutes*, tendo essa mudança, justificada, em parte, pela análise de uma série de marcadores filogenéticos conservados. Esta classificação é ainda apoiada pela ausência de parede celular, característica desses micro-organismos. As sequências do gene 16S rRNA contribuem para sua classificação em grupos filogenéticos, sendo essa sequência obrigatória para a caracterização de novas espécies. Além disso, a atribuição de espécie aos grupos é

feita principalmente por hibridação DNA-DNA, sorologia e semelhança na sequência do gene 16rRNA. Algumas espécies foram atribuídas individualmente a grupos filogenéticos, clusters, e subclusters que também compartilham outras características (BERGEY's, 2009, 2010; BROWN; WHITCOMB; BRADBURY, 2007; WEISBURG et al., 1989).

A natureza dos mollicutes tem representado um desafio na compreensão da sua biologia, classificação e taxonomia. Por muito tempo, os micoplasmas foram considerados vírus, devido a capacidade de transpor filtros que bloqueavam a passagem de bactérias (RAZIN, 1992). Os membros da classe *Mollicutes* são caracterizadas pelo genoma de tamanho reduzido (0,58 - 2,2 Mb), ausência de parede celular (RAZIN, 1998) e por apresentarem requerimentos nutricionais diferenciados quando comparados à maioria das bactérias de interesse veterinário e humano. Aminoácidos, nucleotídeos e esteróis exógenos são utilizados para seu crescimento *in vitro*. O esterol, presente no soro ou células do hospedeiro é incorporado pela membrana da maioria das espécies. Este composto contribui na fluidez necessária à membrana e confere resistência parcial à lise osmótica (RUHNKE; ROSENDAL, 1994).

A membrana dos micoplasmas tem composição semelhante às das eubactérias e está exposta ao ambiente, com exceção de poucas espécies que possuem glicocalíce (WIESLANDER et al., 1992). Localizam-se principalmente nas células de mucosas e com potencial de invasão (VOELKER; DYBVIG, 1996). As mutações têm sido mencionadas como estratégia de sobrevivência, que podem ter ocorrido em função da evolução associada a perdas genômicas (DAVID et al., 2002).

Não apresentam flagelos, entretanto, algumas espécies exibem deslizamento sobre superfícies líquidas. Alguns micoplasmas possuem um tipo de estrutura ou prolongamento polar em sua superfície, onde há alta concentração de moléculas de adesão, que permitem a sua aderência à célula hospedeira (RAZIN, 1992). Acredita-se que estas estruturas, em algumas espécies como *Mycoplasma penetrans*, de origem humana, estejam envolvidas na invasão celular (LO et al., 1992).

Os mollicutes exibem estrita relação aos hospedeiros e especificidade a tecidos e órgãos, que reflete as suas características nutricionais e adaptação parasitária. Estas bactérias podem ocorrer em hospedeiros e tecidos diferentes de seu "habitat" normal, entretanto, como observado por Goulet et al. (1995) existem variações e

eventualmente é possível isolar espécies de sítios e hospedeiros diferentes daqueles habituais (ERICKSON; ROSS; BOVE, 1988; HORNOK et al., 2012; ISO et al., 2013; RAZIN, 1992; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; WAITES et al., 1987).

A maioria dos mollicutes vivem como comensais, e em muitos artrópodes podem mesmo ser considerados simbiossiontes. Infecções com micoplasmas patogênicos são raramente agudas e usualmente seguem um curso crônico (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Os *Mollicutes*, principalmente as espécies encontradas em mamíferos, apresentam-se como "parasitas ideais", geralmente vivendo em harmonia com seu hospedeiro, mas, por outro lado, são também considerados como "oportunistas ideais". Diversas doenças nos seus respectivos hospedeiros são causadas ou associadas aos *Mollicutes* (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Estas bactérias parecem preferir estabelecerem-se em nichos com células em constante renovação favorecendo a sua adesão (GABRIDGE; CHANDLER; DANIELS, 1985).

Micoplasmas, em especial as espécies com os menores genomas, têm altas taxas de mutação, o que sugere que eles estão em um estado de evolução rápida. Esses dados foram confirmados por estudos de sequências de genes 5S rRNA que incluiu uma série de acholeplasmas, anaeroplasmas, micoplasmas, ureoplasmas e *Clostridium innocuum* (BOVÉ, 1999; RAZIN, 1995; ROGERS et al., 1985).

Quanto ao seu metabolismo, os *Mollicutes* podem ser divididos em fermentadores e não-fermentadores. Os fermentadores produzem ácidos por meio da metabolização de glicose e de outros carboidratos, diminuindo o pH do meio de cultivo, e os não-fermentadores possuem a via da arginina-deidrolase para obtenção de ATP, aumentando o pH (RAZIN, 1978, 2004). Quando ambas as vias ocorrem, os ácidos produzidos da glicólise podem mascarar a alcalinização do caldo causada pela hidrólise da arginina (BASEMAN; TULLY, 1997; OLSON et al., 1993; RAZIN, 2004).

Um dos maiores empecilhos na pesquisa e no diagnóstico laboratorial das infecções causadas por mollicutes tem sido a dificuldade em cultivá-los *in vitro*. Apresentam crescimento lento, mesmo utilizando-se o meio de cultivo adequado (RAZIN, 1994). A temperatura de aproximadamente 37 °C é indicativa do "habitat" natural dos mollicutes que corresponde à dos mamíferos, répteis, peixes, artrópodes e plantas. O crescimento e sobrevivência dos mollicutes em meio de cultura são dependentes do pH. Para espécies originárias de plantas e vertebrados, o pH ótimo

é de 7,4 e o crescimento ocorre entre pH 6,5 a 8,0 (RAZIN et al., 1978). A inibição do crescimento pode ocorrer pela excessiva produção de ácidos ou álcalis gerados pelo metabolismo microbiano primário.

Esses micro-organismos apresentam colônias de 50 – 500 µm de diâmetro, usualmente em forma de “ovo frito” quando cultivados em meio sólido, visualizadas com o auxílio de microscópio estereoscópio (Figura 4). Em meio líquido, o crescimento geralmente não causa turvação, provocando somente alteração no pH, revelado por um indicador presente no meio de cultura (MILES, 1992; RAZIN, 1998).

A complexidade dos requerimentos nutricionais, a variação na forma celular e a fragilidade osmótica fazem com que os *Mollicutes* estejam sob constantes investigações quanto a sua fisiologia para relatar seu crescimento e ecologia. As condições sob as quais eles crescem podem influenciar na estrutura e funcionamento das células hospedeiras, sendo importante, não somente para os fisiologistas, como também para todos micoplasmologistas envolvidos em estudos quantitativos (BALABANOV et al., 2006; MILLES, 1992; RAZIN et al., 1978; RODWELL, 1983; TULLY, 1985).

**Figura 4** – Crescimento de *M. hominis* em meio SP4 com a produção de colônia em forma de “ovo frito” (aumento 40X).



Fonte: Arquivo pessoal.

### **2.3.2 Mollicutes, Microbiota Intestinal e Obesidade**

A ocorrência e participação da classe *Mollicutes* na microbiota intestinal e sua relação com a obesidade ainda é praticamente desconhecida. No entanto, Turnbaugh et al. (2008) investigaram a relação dieta, ecologia microbiana intestinal e o balanço energético a partir de um modelo murino de obesidade induzido por meio do consumo de uma dieta ocidental. Observou-se que a dieta ocidental estimulou o crescimento de organismos da classe *Mollicutes*, que posteriormente foram reduzidos por subseqüentes manipulações dietéticas para limitar o ganho de peso. O transplante de microbiota de ratos com obesidade induzida por dieta para destinatários *germ-free* promoveu uma maior deposição de gordura do que em animais que receberam o transplante a partir de doadores eutróficos. Metagenômica e análises bioquímicas do microbioma intestinal em conjunto com sequenciamento e reconstruções metabólicas associadas ao intestino humano revelaram que a bactéria *Eubacterium dolichum* (um membro da classe *Mollicutes*) apresenta características que podem fornecer uma vantagem competitiva aos membros desse ramo, em relação aos nutrientes da dieta ocidental. Essas vantagens relacionam-se com a importação e transformação de açúcares simples através do Sistema fosfotransferase (PTS).

Sistemas fosfotransferase (PTS) são uma classe de sistemas de transporte envolvidas na absorção e na fosforilação de uma grande variedade de hidratos de carbono (DEUTSCHER et al., 2006). Cada transportador envolve três enzimas de ligação que atuam como receptores e doadores de grupos fosforil: duas enzimas citoplasmáticas que atuam em todos os hidratos de carbono PTS importados (HPR e EI), e o outro é um complexo de hidratos de carbono específico (EII) compreendendo um ou dois domínios integrais de membrana hidrofóbicos (EIIC / D) e dois domínios hidrofílicos (EIIA / B) (DEUTSCHER et al., 2006). Fosfoenolpiruvato embora produzidos através da glicólise, pode ser usado para gerar ATP (através da piruvatoquinase) ou usado para conduzir a importação de açúcares adicionais através da transferência de um grupo fosfato para EI do PTS.

Genes PTS são encontrados em várias divisões de bactérias, incluindo *Proteobacterias*, tais como *E. coli*, bem como vários *Firmicutes* e *Mollicutes* sequenciados (Por exemplo, *Mycoplasma genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*, *M. penetrans*, *M. gallisepticum*, *M. mycoides*, *M. mobile*, *M. hyopneumoniae*, *M.*

*synoviae* e *M. capricolum*) (KANEHISA et al., 2004). O PTS também desempenha um papel na regulação da expressão do gene microbiano através da repressão catabólica, permitindo que a célula passe a importar preferencialmente açúcares simples em relação a outros hidratos de carbono (DEUTSCHER et al., 2006). Múltiplos componentes do PTS estão presentes no microbioma da dieta ocidental (EI e HPr mais EII), o que poderia permitir a importação de açúcares simples (por exemplo, glicose e frutose que juntos formam sacarose, um componente abundante da dieta ocidental), bem como açúcares associados com a mucosa do intestino do hospedeiro (N-acetil-galactosamina). O microbioma da dieta ocidental também contém genes que suportam o metabolismo destes açúcares fosforilados para vários produtos finais de fermentação anaeróbia (por exemplo, lactato e a cadeia curta de ácidos graxos, butirato e acetato (DEUTSCHER et al., 2006).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo geral*

Analisar a participação da Classe *Mollicutes* e dos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal de mulheres obesas e eutróficas;

#### 3.2 *Objetivos específicos*

- Determinar o estado nutricional das mulheres obesas do grupo caso e eutróficas do grupo controle;
- Determinar o consumo alimentar das mulheres obesas do grupo caso e eutróficas do grupo controle;
- Desenvolver um ensaio quantitativo por meio de TaqMan PCR para a detecção de *Mollicutes* na microbiota intestinal de mulheres obesas e eutróficas;
- Quantificar os micro-organismos da Classe *Mollicutes* e dos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, além de Bactérias Totais por meio da PCR em tempo real em amostras de fezes de mulheres obesas e eutróficas;
- Analisar a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL6, IL17-A e TNF- $\alpha$  em amostras de sangue coletadas de mulheres obesas e eutróficas;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 *Protocolo do estudo*

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de Micoplasmas do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB II/USP) com o Ambulatório de Obesidade e Síndrome Metabólica do Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) (protocolo de pesquisa nº 1107/13) e pela Comissão de Ética da Instituição HC-FMUSP. Todas as mulheres foram recrutadas a partir da demanda espontânea do serviço, tendo sido inseridas no protocolo após explicação sucinta e individual do mesmo, e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme preconiza a resolução 196/06 do Conselho Nacional de Saúde.

### 4.2 *Casuística*

As coletas foram realizadas entre os meses de Outubro de 2013 à Dezembro de 2014. Para obtenção de resultados pela metodologia proposta para este estudo, a casuística foi de 40 mulheres, sendo 20 diagnosticadas com obesidade apresentando Índice de massa corporal ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ) e 20 mulheres em eutrofia ( $IMC$  entre 18,5 e 24,9  $\text{kg/m}^2$ ). As mulheres diagnosticadas com obesidade foram recrutadas no grupo de Obesidade e Síndrome Metabólica do serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Foram utilizados como critérios de exclusão para esse grupo a presença de quadros infecciosos com sinais clínicos, uso de antibióticos (3 meses antes do estudo), quimioterapia, radioterapia, gravidez, uso de probióticos, cirurgias prévias no Trato Gastrointestinal, doenças do Trato Gastrointestinal como Doença de Crohn e Síndrome do Cólon Irritável. Devido ao fato de haver dificuldade para distinção de alimentos classificados como prebióticos, a ingestão destes não foi incluída como critério de exclusão do estudo. O grupo controle foi composto por mulheres adultas

eutróficas, recrutadas na comunidade, sem nenhuma enfermidade aparente, tendo sido fixados os mesmos critérios de exclusão adotados para o grupo controle.

### ***4.3 Delineamento experimental***

As mulheres foram submetidas à coleta de material fecal e de sangue, além de questionário semiestruturado como instrumento de coleta. Tal instrumento foi construído através de consulta em periódicos científicos e livros acadêmicos que descrevem preditores importantes em relação a fatores etiológicos, predisponentes e mantenedores da obesidade e possível associação com microbiota intestinal e ambiente. Foram consideradas questões que avaliavam história familiar, clínica, obstétrica, ginecológica, consumo de álcool e tabaco, além de questões que avaliavam os hábitos alimentares, como a prática de dietas para emagrecer e número de refeições realizadas. Foi utilizado para esse estudo o IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) versão curta, originalmente desenvolvido com finalidade de estimar o nível de prática habitual de atividade física de populações de diferentes países (BARROS; NAHAS, 2000). O questionário foi elaborado de modo a facilitar a obtenção de informações durante a consulta com os pacientes e realizadas por indivíduos previamente instruídos para o desenvolvimento do estudo, tendo as variáveis, sido agrupadas em 9 Seções que representam a subcategorização das variáveis independentes, para determinação do perfil da população estudada (Anexo B).

### ***4.4 Determinação do estado nutricional***

#### ***4.4.1 Avaliação qualitativa do consumo alimentar***

Para investigar possíveis relações entre alimentos e nutrientes da dieta e microbiota intestinal, utilizou-se o questionário de frequência alimentar semi-quantitativo (QFA), composto por 62 itens alimentares, proposto por Fisberg et al. (2008) que desenvolveram um QFA para utilização em estudos epidemiológicos com indivíduos adultos, desenhados para testar hipóteses epidemiológicas e nutricionais em estudos conduzidos primariamente em São Paulo para estimar o teor de nutrientes da dieta

habitual o que é de fundamental importância para estimar a medida de exposição aos fatores dietéticos e investigar as possíveis associações com desfechos de interesse.

Representou-se a frequência de consumo alimentar em 8 categorias, a saber: diário (mais de três vezes por dia, duas a três vezes por dia, uma vez por dia), semanal (cinco a seis vezes por semana, duas a quatro vezes por semana, uma vez por semana), mensal (uma a três vezes por mês) e nunca ou quase nunca. Os dados sobre o consumo alimentar foram inseridos em planilha eletrônica com auxílio do estudo de Giacomello et al., (2008). Inicialmente, converteu-se a frequência de consumo de cada alimento em frequência diária como proposto por Coelho et al (2011). Para tanto, atribuiu-se ao alimento valor 1 (um) quando consumido 1 vez ao dia. Caso o alimento fosse consumido mais de uma vez ao dia, multiplicava-se o valor 1 pelo intervalo da frequência diária relatada. Para as opções que contemplaram intervalos de tempo semanal e mensal, utilizou-se a média do intervalo das frequências, dividido pelo período, se semanal (7) e mensal (30), conforme descritos no Quadro 01.

**Quadro 01**– Critérios utilizados na estimativa da frequência diária de consumo dos alimentos incluídos no Questionário de Frequência Alimentar.

<i><b>Frequência Relatada</b></i>	<i><b>Frequência diária</b></i>
3 ou mais vezes/dia	$3*1=3$
2 a 3 vezes/dia	$2,5*1= 2,5$
1 vez/dia	$1*1= 1$
5 a 6 vezes/semana	$5,5/7= 0,79$
2 a 4 vezes/semana	$3/7= 0,43$
1vez/semana	$1/7= 0,14$
1 a 3 vezes/mês	$2/30= 0,07$
1 vez/mês	$1/30= 0,03$
Nunca/Quase nunca	0

Posteriormente, foram construídos os grupos dos alimentos segundo o registro do QFA. Adotou-se como critério para a inclusão do alimento no respectivo grupo, o consumo igual ou maior a 10% e as características nutricionais (HAIR et al., 2005). Considerando este critério, foram construídos 16 grupos de alimentos: (1) massas; (2) preparações; (3) carne vermelha e ovos; (4) embutidos; (5) carne branca; (6) leite e derivados; (7) leguminosas; (8) cereais raízes e tubérculos; (9) hortaliças; (10) frutas; (11) industrializados; (12) infusão; (13) bebida alcoólica; (14) óleos e gorduras; (15) lanches; (16) açúcares e doces.

Os dados referentes ao QFA também foram utilizados para calcular o consumo energético e de nutrientes. Primeiramente estes foram transformados em gramas, utilizando-se uma tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras (PINHEIRO et al., 2002) e, em seguida, lançados no Software Excel para digitação dos dados do consumo alimentar e para o cálculo de consumo de macro e micronutrientes. Para preencher o banco de dados do Software com alimentos e preparações consumidas pelas participantes, foram utilizadas as Tabelas de composição de alimentos PHILIPPI (2002) e TACO (2006), com a Tabela de medidas caseiras (PINHEIRO et al., 2005) além de dados adicionais de Composição química de alimentos compilados da Tabela de Composição de Alimentos da Fundação Instituto brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Os valores obtidos foram comparados com os valores de recomendação propostos pelo *United States Department of Agriculture* (USDA) em seus documentos *Dietary References Intakes* (DRI) referentes aos valores de *Estimated Average Requirements* (EAR) e, para os nutrientes que ainda não possuem esse valor definido, utilizou-se como parâmetro valores de *Adequate Intake* (AI).

#### **4.4.2 Avaliação antropométrica do estado nutricional**

A mensuração do peso corporal em quilogramas (kg) foi realizada em duplicata, considerando-se o peso médio. Para tal, foi utilizada uma balança digital Filizola®, com capacidade máxima para 150 kg e precisão de 100 g, estando as participantes da pesquisa descalças e com roupas leves. A estatura em centímetros (cm) foi realizada em duplicata, considerando-se a estatura média. As medidas foram determinadas por meio de um estadiômetro graduado em centímetros com precisão de 1,0 mm, apresentando barra de madeira vertical e fixa, com esquadro móvel para posicionamento sobre a cabeça do indivíduo quando os mesmos

estavam descalços, em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturrilhas, glúteos, ombros e cabeça encostados no estadiômetro, olhando-se para frente.

O Índice de Massa Corpórea (IMC) foi calculado pelo peso e estatura, a partir das quais foi determinada a relação entre o peso e altura em metros ao quadrado e avaliado segundo os pontos de corte preconizados pela OMS assim designados: baixo peso (IMC < 18.5 Kg/altura<sup>2</sup>), eutrofia (IMC= 18.5 a 24.9 kg/altura<sup>2</sup>), sobrepeso (IMC= 25 a 29.9 Kg/altura<sup>2</sup>) e obesidade (IMC >30 Kg/ altura<sup>2</sup>) (WHO, 1998).

#### 4.4.2.1 Análise da Composição Corporal pelo Método de Bioimpedância

O aparelho de bioimpedância elétrica utilizado para a avaliação da composição corporal foi o InBody 720 (Biospace, Coreia), que consiste em bioimpedância octopolar, através de oito pontos de contato pelos quais passa a corrente elétrica, na extremidade dos quatro membros, determinando a porcentagem de gordura e massa magra em cada membro, assim como no tronco.

A avaliação foi realizada respeitando os procedimentos apresentados no respectivo manual de uso do aparelho, atendendo as seguintes condições de pré-teste, (1) estar em jejum, (2) não consumir álcool 48 horas antes do teste, (3) não realizar exercício de intensidade moderada a elevada nas 12 horas antes da avaliação, (4) não efetuar o exame perante em estado febril ou de desidratação; (5) não utilizar bijuterias metálicas ou implantes dentários com metal; (6) não ingerir café e; (7) realizar a avaliação com roupa de banho ou roupas íntimas.

O relatório da bioimpedância Octopolar é dividido em quatro partes informativas de dados obtidos:

1. Análise da Composição Corporal: identifica como está distribuída a água corporal total, percentual de massa magra e massa de gordura livre;
2. Análise Músculo-gordura: mostra em kg o peso, a massa de músculo esquelético, e a massa de gordura;
3. Diagnóstico da obesidade: discrimina o IMC, PGC (porcentagem de gordura corporal), e RCQ (relação cintura-quadril);
4. Área de Gordura Visceral: informa a área de gordura visceral em cm<sup>2</sup>.

#### **4.5 Coleta das amostras clínicas**

Para a obtenção das amostras de fezes, as mulheres foram previamente instruídas de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* NCCCLS (2007), evacuando diretamente no coletor plástico estéril fornecido juntamente com luvas, espátula coletora e etiqueta de identificação. O material foi acondicionado em caixa isotérmica, resfriada com gelo e transportado imediatamente ao Laboratório de Micoplasmas, ICB/USP. As amostras de fezes foram distribuídas em aliquotas (180-200 ug) em microtubos e acondicionadas -80°C até a análise laboratorial.

Para a realização da coleta do material sanguíneo, o operador munido de EPIs realizou punção venosa periférica, preferencialmente, em membro superior não dominante. Foram coletados cerca de 5 mL de sangue por tubo/paciente, tendo sido utilizados tubos não-heparinizados que foram conservados de forma similar aos coletores, em caixa isotérmica refrigerada. O material obtido foi levado até o Laboratório de Micoplasmas, ICB/USP, onde as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm para obtenção do soro, seguido de sua distribuição em alíquotas de cerca de 1 mL e estocados a -80 °C até o uso.

## **4.6 Determinação da microbiota intestinal**

### **4.6.1 Padronização de reação de PCR quantitativo (qPCR) por meio de TaqMan para a detecção de *Mollicutes***

#### **4.6.1.1 Cepas bacterianas e condições de cultura**

Como controle positivo utilizou-se a cepa ATCC 23114 (PG-21) de *M. hominis*. Também foram utilizados como controle os seguintes micro-organismos obtidos da coleção do Laboratório de Micoplasmas ICB/USP.: *Mycoplasma bovis* Donetta, *M. arginini* G230, *M. dispar* M29/79, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis* PG34, *M. gallisepticum* PG31, *M. synoviae* WUU1853, *M. penetrans* ATCC 55252 (GTU 54), *M. fermentans* PG18, *M. pulmonis* PG34, *M. hyorhinis*, *M. genitalium* ATCC 33530 (G37), *M. buccale*, *M. edwardii* PG24, *M. gateae*, *M. faucium*, *M. felis* CO, *M. bovis*, *Spiroplasma mirum* (SMCA), *Acholeplasma laidlawii* PG38, *Ureaplasma diversum* ATCC 449782, *U. urealyticum* T960, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12345, *Salmonella typhimurium* C5 CIP, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 e *Bacillus cereus*. As cepas referentes aos micro-organismos *Bacteroides fragilis* C45A AUS 00306, e *Clostridium perfringens*, foram cedidas pelo Professor Dr. Jorge Luiz Melo Sampaio, pesquisador associado do Instituto Fleury. As espécies de Ureaplasmas foram cultivadas em meio UB específico para ureaplasma com 5% de CMRL-1066 (com glutamina e sem bicarbonato), enquanto as espécies de Micoplasmas foram cultivadas em meio de cultura SP4, como descrito por Tully et al. (1995). As bactérias com parede celular incluídas como controles foram cultivadas em meio de infusão de cérebro-coração (BHI). Destas cepas, o DNA foi extraído a partir de culturas em fase logarítmica por meio do kit Pure Link™ Genomic DNA, da Invitrogen®.

#### **4.6.1.2 Desenvolvimento de primers e sonda para a detecção de *Mollicutes* pela PCR quantitativa**

Os oligonucleotídeos iniciadores e as sondas foram selecionadas com base no fragmento conservado do gene 16S rRNA específico para a classe *Mollicutes*. As sequências do gene 16S rRNA de micoplasmas foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW do Software MEGA4. As regiões variáveis foram selecionadas

manualmente para o sequenciamento dos iniciadores e sondas utilizadas neste ensaio. Propriedades dos oligonucleotídeos foram também analisadas pelo Software Primer Express ver. 3.0 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). A especificidade dos iniciadores e da sonda foi testada “in silico”, utilizando algoritmos BLAST.

O quadro 02 mostra as sequências, *forward* e *reverse*, selecionadas para amplificar um fragmento conservado do gene 16S rRNA específico de *Mollicutes*. A sonda TaqMan, específica para o fragmento amplificado, foi desenvolvida por uma fonte comercial (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation).

**Quadro 2** - Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *Mollicutes*.

Iniciadores	Sequência
Molli1	5' GCA TTA GAT GAT CCG CCT GAG T 3'
Molli2	5' GTC CCC GTC AAT TCC TTT AAG TT 3'
Sonda	5' GTC CCC GTC AAT TCC TTT AAG TT 3'

#### 4.6.1.3 PCR quantitativa

Ensaio de quantificação absoluta do DNA alvo foram realizados com sistema de PCR em tempo real (qPCR) *StepOne* (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). Diferentes concentrações de cada primer iniciador e sonda foram testados para aprimorar a reação de qPCR. Considerou-se ideal as seguintes características:  $r^2 \geq 0,950$ , eficiência entre 95 a 105% e *slope* próximo de -3,32.

A melhor reação, obtida foi a partir de 6,25  $\mu$ l de Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu$ M de cada iniciador, 0,5  $\mu$ M de sonda TaqMan MGB marcada com corante fluorescente, 2,5  $\mu$ l de DNA extraído, e água sem RNase para o volume final de 12,5  $\mu$ l. As condições de amplificação foram: 50 °C por 10 min; 95 °C por 10 min; e 45 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 s, anelamento a 59 °C durante 1 min. Todas as reações foram realizadas em duplicata, no aparelho PCR em tempo real *StepOnePlus* (Applied Biosystems).

Para a construção de padrões de DNA para a quantificação absoluta, utilizou-se como controle positivo a cepa de referência – *M. hominis* ATCC 23114 (PG-21), que foi inicialmente cultivada em 1 ml de caldo SP4 a 37 °C e expandidos até 100 ml. Na fase de crescimento logarítmico, (com base em alterações colorimétricas), a cultura foi centrifugada a 20.600 rpm durante 30 minutos a 25 °C. O DNA foi extraído usando o kit *PureLink™ Genomic DNA Mini*. O número de cópias de DNA genômico foi calculado por espectrofotometria (*NanoDrop ND -1000*, WITec Ag, Littau, Suíça). Diluições decimais ( $10^7$ - 1 cópias/ $\mu$ l) do DNA de *M. hominis* para curva padrão foram preparadas e analisadas.

Os dados foram obtidos durante a etapa de anelamento e analisados pelo Software StepOne 2.1 (*Applied Biosystems, Life Technologies Corporation*). O limiar foi ajustado manualmente dentro da curva logarítmica, acima do nível de detecção basal, e abaixo da fase linear e do platô. O ciclo limiar (*Ct-threshold cycle*) das diluições do genoma foi plotado contra o número de log de cópias do genoma e utilizado como entrada para criar a curva padrão. Análises de regressão linear foram aplicadas para calcular os valores de  $r^2$  e do *slope*. Assumindo a eficiência de 100%, se o molde de DNA é duplicado em cada ciclo, a eficiência da PCR foi calculada como  $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ , onde E é a eficiência da PCR.

#### 4.6.1.4 Especificidade da qPCR e repetibilidade intra e inter-ensaios

O DNA dos micro-organismos utilizados como controles foi testado para verificar a especificidade dos ensaios de qPCR (descrito em cepas bacterianas). A repetibilidade intra-ensaio foi determinada executando cinco repetições das diluições do genoma de *M. hominis* ( $10^7$  a 1 cópia do genoma bacteriano/reação) na mesma reação. A curva padrão foi gerada utilizando o software StepOne 2.1 (*Applied Biosystems, Life Technologies Corporation*). A repetibilidade inter-ensaio foi obtida por reações em triplicatas com a mesma diluição do genoma em três ensaios diferentes, em dias separados e consecutivos. Estas repetições foram aplicadas para determinar a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação em valores de *Ct* para cada diluição do genoma.

#### **4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional**

As amostras clínicas também foram submetidas a PCR convencional para a detecção da Classe *Mollicutes* utilizando-se dos os iniciadores descritos por Van Kuppeveld et al. (1992). Água livre de nuclease foi utilizada como controle negativo em ambos os ensaios. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio 0,5 mm/mL e tampão TAE (Trisacetate 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Os produtos foram visualizados e foto documentados sob luz ultravioleta utilizando um sistema foto documentador (Vilber Lourmat, Marne-la-Valle'e, França).

#### **4.6.3 Detecção de micro-organismos dos filios *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e bactérias totais (*Eubacterias*) por PCR em tempo Real (qPCR)**

Para a construção de padrões de DNA para a quantificação absoluta de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* utilizou-se como controles positivos, as cepas de referências – *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*, respectivamente. Para a quantificação de Bactérias Totais (*Eubactérias*), foi utilizado como controle positivo *Clostridium perfringens*. Os controles foram submetidos à extração de DNA por meio do kit QIAamp DNA stool – QIAGEN baseado no protocolo de extração sugerido pelo fabricante. Para os filios *Firmicutes*, *Bacteroidetes* assim como Bactérias totais foram utilizadas sequencias de iniciadores descritos por Guo et al. (2008), apresentadas no quadro 3.

**Quadro 3** – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e Bactérias Totais (*Eubactérias*).

Iniciadores	Sequência	Referência
Firm934F	5' GGA GYA TGT GGT TTA ATT CGA AGC A 3'	GUO et al., 2008
Firm1060R	5' AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC 3'	
Bact934F	5' GGA RCA TGT GGT TTA ATT CGA TGA T 3'	GUO et al., 2008
Bact1060R	5' AGC TGA CGA CAA CCA TGC AG 3'	
Eub338F	5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	FIERER et al., 2005
Eub518R	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	

Os micro-organismos foram quantificados de modo absoluto baseando-se em curva padrão previamente estabelecida. Para cada reação finalizada, uma nova curva padrão foi adicionada e parâmetros de qualidade foram adotados na análise, sendo estes:  $r^2 \geq 0.950$ , eficiência da reação variando de 95% a 105% e slope próximo de -3.32.

As reações de qPCR foram realizadas em volume final de 12,5  $\mu$ L com 6,25  $\mu$ L da mistura universal *SYBR Green* (*Applied Biosystems* São Paulo, S.P., Brasil), 0,25  $\mu$ M de cada primer específico, 4,5  $\mu$ L de água e 1,25  $\mu$ L de DNA extraído, com volume final de 12,5  $\mu$ L. As quantificações foram realizadas utilizando-se a plataforma *Applied Biosystems* (*Life Technologies Corporation*), com os seguintes parâmetros: 50 °C por 10 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, seguidas da curva de *melting* (15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 15 segundos a 95 °C e 15 segundos e 60 °C).

#### **4.7 Dosagem de citocinas do soro sanguíneo**

A dosagem das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL17-A foram realizadas utilizando-se kit de ELISA de captura (eBioscience, San Diego, C. A., Estados Unidos) em placas de poliestireno com 96 orifícios e alta absorção de acordo com protocolo indicado pelo fabricante. Após padronização da curva padrão, a alíquota de 100  $\mu$ L do sobrenadante das células foi utilizada para dosar as citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL17-A. A leitura foi realizada com instrumento leitor de ELISA *Vivid*

*Vision* com comprimento de onda de 450 nm. Os dados obtidos em absorbância foram transformados em picomols por meio de fórmula matemática.

#### **4.8 Análises Estatísticas**

As análises estatísticas da presença dos microrganismos da classe *Mollicutes* detectados nas amostras clínicas e dos dados obtidos dos questionários foram avaliados por meio do software SPSS 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, Estados Unidos). Para comparar variáveis de consumo alimentar e as variáveis relacionadas ao perfil da população estudada, entre os grupos caso e controle, foi aplicado Teste de qui-quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher, tendo sido considerado  $p < 0,05$  e IC 95%. O teste t que compara média entre grupos, foi utilizado para verificar a existência de associação entre as variáveis desfecho (mulheres obesas x mulheres eutróficas) e as variáveis *Mollicutes* (presença x ausência), com o consumo alimentar dos macronutrientes carboidratos, proteínas, lipídeos e fibras ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, para verificação de associação entre as variáveis desfecho e a presença de *Mollicutes*, foi aplicado Teste de qui-quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher, tendo sido calculada a razão de chances (*odds ratio*) (I.C. 95%) com o objetivo de verificar o poder da associação entre as variáveis supracitadas.

Para verificar as distribuições de cargas dos micro-organismos estudados em ambos os grupos avaliados, inicialmente foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, que demonstrou não satisfazer a pré-suposição para utilização de um teste paramétrico. A partir desse resultado, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, amplamente utilizado para amostras pareadas, que não seguem distribuição normal. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software, San Diego California, USA), sendo estabelecida a existência de significância estatística quando o valor de  $p \leq 0,05$  em todas as análises.

Para análise dos dados de quantificação das citocinas também foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 5.00 (*GraphPad Software*, San Diego California, USA) tendo sido realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfil da população estudada

A amostragem do estudo envolveu 40 mulheres sendo 20 classificadas com obesidade (IMC  $>30$  Kg/m<sup>2</sup>) e 20 em eutrofia (IMC 18.5 - 24.9 Kg/m<sup>2</sup>) com média de idade de 38 anos para todas as mulheres, 44 anos (DP: 9,3; Amplitude: 28-57) para as mulheres obesas do grupo caso e 33 anos (DP: 12,04; Amplitude:22-66) para as mulheres eutróficas do grupo controle.

No presente estudo as variáveis foram agrupadas em 9 Seções, com resultados descritivos representados nas tabelas de 1 a 9, que representam a subcategorização das variáveis independentes, para determinação do perfil da população estudada.

O grupo das mulheres obesas, foi caracterizado pela maioria de cor preta, parda ou indígena (70%), onde as moléstias atuais associadas mais frequentes foram hipertensão (30%), dispneia (35%), constipação (35%), refluxo (35%) e alteração menstrual (55%). A maioria das mulheres nasceram de parto normal (75%), foram amamentadas (90%), já tiveram filhos (70%) e foram classificadas como fisicamente ativas (60%). Além disso, 13 (65%) das mulheres do grupo caso referiram fazer três ou mais refeições por dia. Em relação ao grupo das mulheres eutróficas, esse foi caracterizado pela maioria de cor branca ou amarela (55%), onde as moléstias atuais associadas mais frequentes foram hipercolesterolemia (5%), dispneia (5%), gastrite (15%) e constipação (20%). Metade das mulheres nasceram de parto normal (50%) e foram amamentadas (85%), enquanto 2 (10%) tiveram filhos e 9 (55%) foram classificadas como fisicamente ativas. Assim, como o grupo caso, 13 (65%) das mulheres do grupo controle, referiram fracionar sua refeição em três ou mais por dia.

Além disso, observa-se com base nos resultados estatísticos que houve variação significativa na comparação das variáveis relacionadas ao perfil da população estudada. Em relação à Seção 1: História Clínica, foram encontradas variações significativas para as variáveis associadas ao trato gastrointestinal: flatulência ( $p=0,008$ ), refluxo ( $p=0,018$ ), azia ( $p=0,008$ ) e para as variáveis associadas à Moléstia atual: hipertensão ( $p=0,008$ ), dispnéia ( $p=0,008$ ) e alteração menstrual ( $p=0,000$ ). Em relação à Seção 4: História Obstétrica, foi encontrada

variação significativa para a variável gestação ( $p=0,000$ ). Para a Seção 5: História ginecológica, observou-se variação estatística para a variável menopausa ( $p=0,038$ ).

**Tabela 1** – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 1: Dados socioeconômicos. São Paulo, SP, 2013-2014.

Variáveis	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	IC 95%	P*
<b>Raça/cor</b>				
Preta/Parda/Indígena	14 (70%)	9 (45%)	0,09-1,28	0,110
Branca/Amarela	6 (30%)	11 (55%)		
<b>Escolaridade</b>				
< Ensino Médio	1 (5%)	0 (0%)	0,96-1,28	0,147
≥ Ensino Médio	19(95%)	20 (100%)		
<b>Relação Estável</b>				
Sim	11 (55%)	10 (50%)	0,23-2,83	0,752
Não	9 (45%)	10 (50%)		
<b>Renda familiar</b>				
< 2 salários mínimos <sup>a</sup>	9 (45%)	5 (25%)	0,10-1,55	0,185
≥ 2 salários mínimos <sup>a</sup>	11 (55%)	15 (75 %)		

Nota: n= 20 mulheres.<sup>a</sup> – Considerou-se como valor de Salário Mínimo (R\$ 678,00). \*– Significância estatística quando p-valor ≤ 0,05

**Tabela 2** – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 2: História Familiar. São Paulo, SP, 2013-2014.

Variáveis	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	IC 95%	P*
<b>Família hipertensão</b>				
Sim	17 (85%)	12 (60%)	0,06-1,20	0,077
Não	3 (15%)	8 (40%)		
<b>Família diabetes<sup>a</sup></b>				
Sim	12 (60%)	8 (40%)	0,13-1,57	0,206
Não	8 (40%)	12 (60%)		
<b>Família obesidade<sup>a</sup></b>				
Sim	13 (65%)	7 (35%)	0,07-1,06	0,058
Não	7(35%)	13 (65%)		
<b>Família hipercolesterolemia<sup>a</sup></b>				
Sim	11 (55%)	12 (60%)	0,35-4,30	0,749
Não	9 (45%)	8 (40%)		
<b>Família Doenças Córdio-vasculares (DCV)<sup>a</sup></b>				
Sim	10 (50%)	10 (50%)	0,29-3,45	1,000
Não	10 (50%)	10 (50%)		

Nota: n= 20 mulheres. <sup>a</sup> – Referente à parentes de primeiro grau paternos e maternos; além de irmãos. \*– Significância estatística quando p-valor ≤ 0,05.

**Tabela 3 – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 3: História Clínica. São Paulo, SP, 2013-2014.**

Variáveis	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	IC 95%	P*
<b>TGI constipação<sup>a</sup></b>				
Sim	7 (35%)	2 (10%)	0,03-1,15	0,058
Não	13 (65%)	18 (90%)		
<b>TGI flatulência<sup>a</sup></b>				
Sim	6 (30%)	0 (0%)	1,07-1,90	0,008*
Não	14 (70%)	20 (100%)		
<b>TGI refluxo<sup>a</sup></b>				
Sim	7 (35%)	1 (5%)	0,01-0,89	0,018*
Não	13 (65%)	19 (95%)		
<b>TGI azia<sup>a</sup></b>				
Sim	6 (30%)	0 (0%)	1,07-1,90	0,008*
Não	14 (70%)	20 (100%)		
<b>TGI úlcera<sup>a</sup></b>				
Sim	1 (5%)	0 (0%)	0,95-1,16	0,311
Não	19 (95%)	20 (100%)		
<b>TGI gastrite<sup>a</sup></b>				
Sim	2 (10%)	3 (15%)	0,23-10,7	0,633
Não	18 (90%)	17 (85%)		
<b>TGI náuseas<sup>a</sup></b>				
Sim	3 (15%)	1 (5%)	0,02-3,14	0,292
Não	17 (85%)	19 (95%)		
<b>TGI vômitos<sup>a</sup></b>				
Sim	1 (5%)	0 (0%)	0,95-1,16	0,311
Não	19 (95%)	20 (100%)		
<b>TGI diarreia<sup>a</sup></b>				
Sim	0 (0%)	0 (0%)	**	**
Não	20 (100%)	20 (100%)		
<b>Moléstia atual: hipertensão<sup>a</sup></b>				
Sim	6 (30%)	0 (0%)	1,07-1,90	0,008*
Não	14 (70%)	20 (100%)		
<b>Moléstia atual: diabetes<sup>a</sup></b>				
Sim	0 (0%)	0 (0%)	**	**
Não	20 (100%)	20 (100%)		
<b>Moléstia atual: hipercolesterolemia<sup>a</sup></b>				
Sim	5 (25%)	1 (5%)	0,01-1,50	0,077
Não	15 (75%)	19 (95%)		
<b>Moléstia atual: DCV<sup>a</sup></b>				
Sim	2 (10%)	0 (0%)	0,96-1,28	0,147
Não	18 (90%)	20 (100%)		
<b>Moléstia atual: Dispnéia<sup>a</sup></b>				
Sim	7 (35%)	1 (5%)	0,01-0,89	0,018*
Não	13 (65%)	19 (95%)		
<b>Moléstia atual: alteração menstrual<sup>a</sup></b>				
Sim	11 (55%)	0 (0%)	1,36-3,60	0,000*
Não	9 (45%)	20 (100%)		
<b>Uso de laxantes<sup>a</sup></b>				
Sim	3 (15%)	0 (0%)	0,97-1,41	0,072
Não	17 (85%)	20 (100%)		

Nota: n=20 mulheres. <sup>a</sup>- Histórico clínico das pacientes em relação à alterações gastrintestinais, moléstia atual e uso de laxantes. \*\*- Diferença estatística não computada, pois a variável é uma constante.

**Tabela 4 –** Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 4: História Obstétrica. São Paulo, SP, 2013-2014.

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo Caso n (%)</b>	<b>Grupo controle n (%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P*</b>
<b>Nascimento por parto cesárea<sup>a</sup></b>				
Sim	5 (25%)	10 (50%)	0,78-11,44	0,102
Não	15(75%)	10 (50%)		
<b>Nascimento por parto normal<sup>a</sup></b>				
Sim	15 (75%)	10 (50%)	0,08-1,27	0,102
Não	5 (25%)	10 (50%)		
<b>Foi amamentada<sup>a</sup></b>				
Sim	18 (90%)	17 (85%)	0,09-4,24	0,633
Não	2 (30%)	3 (15%)		
<b>Teve alguma gestação<sup>a</sup></b>				
Sim	14 (70%)	2 (10%)	0,008-0,273	0,000*
Não	6 (30%)	18 (90%)		
<b>Sofreu algum aborto<sup>a</sup></b>				
Sim	2 (10%)	2 (10%)	0,96-1,28	0,147
Não	18 (90%)	18 (90%)		

Nota: n= 20 mulheres. <sup>a</sup>– Foram considerados aspectos relacionados as pacientes em seu nascimento e na maternidade \*– Significância estatística quando p-valor ≤ 0,05

**Tabela 5 – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 5: História Ginecológica. São Paulo, SP, 2013-2014.**

Variáveis	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	IC 95%	P*
<b>Menopausa</b>				
Sim	9 (45%)	3 (15%)	0,04-0,97	0,038*
Não	11(55%)	17 (85%)		
<b>Usou ou está usando contraceptivo</b>				
Sim	16 (80%)	16 (80%)	0,21-4,70	1,000
Não	4 (20%)	14 (20%)		
<b>Contraceptivo hormonal</b>				
Sim	13 (65%)	15 (75%)	0,41-6,33	0,490
Não	7 (35%)	5 (25%)		
<b>Contraceptivo não hormonal</b>				
Sim	3 (15%)	1 (5%)	0,02-3,14	0,292
Não	17(85%)	19 (95%)		
<b>Idade que começou a ingerir ≥ 22 anos<sup>a</sup></b>				
Sim	10 (50%)	6 (30%)	0,11-1,56	0,197
Não	10 (50%)	14 (70%)		
<b>Idade que começou a ingerir &lt; 22 anos<sup>a</sup></b>				
Sim	2 (10%)	2 (10%)	0,63-8,53	0,197
Não	18 (90%)	18 (90%)		

Nota: n= 20 mulheres. <sup>a</sup>– Idade média em que todas as mulheres estudadas começaram a ingerir contraceptivo: 22 anos. \*– Significância estatística quando p-valor ≤ 0,005.

**Tabela 6 – Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 6: Consumo atual de tabaco. São Paulo, SP, 2013-2014.**

Variáveis	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	IC 95%	P*
<b>Consumo atual de tabaco</b>				
Sim	4 (20%)	1 (5%)	0,02-2,07	0,151
Não	16 (80%)	19 (95%)		
<b>Já consumiu tabaco</b>				
Sim	5 (25%)	5 (25%)	0,23-4,18	1,000
Não	15 (75%)	15 (75%)		

Nota: n= 20 mulheres. \*– Significância estatística quando p-valor ≤ 0,05.

**Tabela 7 –** Determinação do perfil da população estudada referente à Seção 7: Consumo atual de álcool. São Paulo, SP, 2013-2014.

Variáveis	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	IC 95%	P*
<b>Consumo atual de álcool</b>				
Sim	8 (40%)	11 (55%)	0,52-6,43	0,342
Não	12 (60%)	9 (45%)		

Nota: n= 20 mulheres. \*– Significância estatística quando p-valor  $\leq$  0,05.

**Tabela 8 –** Tabela de determinação do perfil da população estudada referente à Seção 8: Atividade Física (IPAQ versão curta). São Paulo, SP, 2013-2014.

Variáveis	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	IC 95%	P*
<b>Nível de atividade física</b>				
Ativa <sup>a</sup>	12 (60%)	9 (45%)	0,15-1,91	0,342
Irregularmente ativa <sup>a</sup>	8 (40%)	11 (55%)		

Nota: n= 20 mulheres. <sup>a</sup>– Para a classificação, foi utilizado o IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) versão curta. Irregularmente ativa: Irregularmente ativa A e B. \*– Significância estatística quando p-valor  $\leq$  0,05

**Tabela 9** – Tabela de determinação do perfil da população estudada referente à Seção 9: Mudanças recentes nos hábitos alimentares. São Paulo, SP, 2013-2014.

Variáveis	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	IC 95%	P*
<b>Mudou hábitos alimentares recentemente</b>				
Sim	7 (35%)	3 (15%)	0,07-1,51	0,144
Não	13 (65%)	17 (85%)		
<b>Mudou hábitos alimentares recentemente para perda de peso</b>				
Sim	7 (35%)	3 (15%)	0,07-1,51	0,144
Não	13 (65%)	17 (85%)		
<b>Mudou hábitos alimentares recentemente para dieta vegetariana ou restrição de consumo carne</b>				
Sim	0(0%)	0(0%)	**	**
Não	20(100)	20(100%)		
<b>Mudou hábitos alimentares recentemente restrição de consumo sal</b>				
Sim	0(0%)	0(0%)	**	**
Não	20(100%)	20(100%)		
<b>Mudou hábitos alimentares recentemente para redução do colesterol</b>				
Sim	0(0%)	0(0%)	**	**
Não	20(100%)	20(100%)		
<b>≥ refeições/dia<sup>a</sup></b>				
Sim	13(65%)	14(70%)	0,33-4,73	0,736
Não	7(35%)	6(30%)		
<b>&lt; refeições/dia<sup>a</sup></b>				
Sim	7(35%)	7(35%)	0,27-3,66	1,000
Não	13(65%)	13(65%)		
<b>Desjejum diariamente</b>				
Sim	13 (35%)	16 (80%)	0,51-9,00	0,288
Não	7(65%)	4 (20%)		
<b>Costuma beliscar entre as refeições</b>				
Sim	11 (55%)	12 (60%)	0,35-4,30	0,749
Não	9 (45%)	8 (40%)		
<b>Costuma ingerir líquidos durante as refeições</b>				
Sim	16 (80%)	12 (60%)	0,09-1,54	0,168
Não	4 (20%)	8 (40%)		
<b>Costuma fazer refeições fora de casa</b>				
Sim	12 (60%)	19 (95%)	1,12-93,3	0,018
Não	8 (40%)	1 (5%)		

Nota: n= 20 mulheres. <sup>a</sup>– Média de refeições diárias: 3 refeições. \*\*- Diferença estatística não computada, pois a variável é uma constante. \*- Significância estatística quando p-valor ≤ 0,05.

## **5.2 Determinação do estado nutricional**

### **5.2.1 Avaliação qualitativa do consumo alimentar**

Na Tabela 10 (apêndice) encontra-se a participação dos alimentos nos grupos e médias de consumo diário dos alimentos pela população estudada. Os alimentos mais consumidos e que apresentaram frequência diária de uma vez ao dia ou mais em relação ao grupo caso foram feijão, arroz, alface, tomate e óleo, azeite ou vinagre para tempero de salada. Em relação ao grupo controle os que apresentaram consumo diário de uma vez ou mais foram arroz e pão francês, pão de forma, integral, pão doce ou torrada.

O percentual de consumo dos 16 grupos alimentares identificados, derivados do QFA (Tabela 11) em relação ao grupo caso, que foram consumidos por 80% ou mais da população, foram massas; carne vermelha e ovos; embutidos; carne branca; cereais, raízes e tubérculos; hortaliças e frutas. No mesmo grupo populacional, os grupos alimentares de menor consumo foram bebida alcoólica; leite e derivados e preparações, com percentuais de consumo de 30%, 49,3% e 52,5%, respectivamente. Os grupos que apresentaram consumo intermediário foram Infusão; Óleos e gorduras; açúcar e doces; lanches; leguminosas e alimentos industrializados, com percentuais de consumo de 60%, 61,6%, 65%, 78,3%, 78,3% e 79%, respectivamente. No grupo controle, os grupos alimentares que apresentaram consumo de 80% ou mais da população foram massa; carne vermelha e ovos; carne branca; cereais, raízes e tubérculos; hortaliças; lanches e açúcar e doces. Ainda nesse grupo populacional, os grupos alimentares de menor consumo assim como no grupo caso, foram bebida alcoólica, preparações e leite e derivados, com percentuais de consumo de 45%, 45% e 48,6% respectivamente. Os grupos que apresentaram consumo intermediário foram óleos e gorduras, Infusão, alimentos embutidos, leguminosas, alimentos industrializados e frutas com percentuais de consumo de 61,6%, 65%, 65%, 65%, 65,7%, 73,1%, respectivamente.

**Tabela 11** – Definição dos grupos alimentares derivados do Questionário de Frequência Alimentar (QFA) e percentual de consumo da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

<b>Grupo Alimentar</b>	<b>Grupo</b>	<b>% Consumo</b>	<b>Alimentos</b>
<b>Massas</b>	<b>Caso</b>	90	Macarrão com molho sem carne, macarrão com molho com carne, lasanha, nhoque, pizza e panqueca.
	<b>Controle</b>	91,6	
<b>Preparação</b>	<b>Caso</b>	52,5	Sopas, polenta cozida ou frita.
	<b>Controle</b>	45	
<b>Carne vermelha e ovos</b>	<b>Caso</b>	88,8	Carne bovina. Carne de porco, carne de sol, bacon e ovo.
	<b>Controle</b>	81,3	
<b>Embutidos</b>	<b>Caso</b>	82,5	Linguiça e embutidos (presunto, mortadela, salsicha).
	<b>Controle</b>	65	
<b>Carne branca</b>	<b>Caso</b>	97,5	Frango, peixe e frutos do mar.
	<b>Controle</b>	95	
<b>Leite e derivados</b>	<b>Caso</b>	49,3	Leite integral, leite desnatado, leite semi-desnatado, iogurte natural, iogurte com frutas, queijo mussarela, queijo prato, parmesão, provolone, queijo minas e ricota.
	<b>Controle</b>	48,6	
<b>Leguminosas</b>	<b>Caso</b>	78,3	Feijão, lentilha, ervilha seca, grão de bico, soja, feijoada, feijão tropeiro.
	<b>Controle</b>	65	
<b>Cereais, raízes e tubérculos</b>	<b>Caso</b>	81,3	Arroz branco integral cozido com óleo e temperos, batata frita, mandioca frita, batata cozida, mandioca cozida, inhame, purê de batatas ou mandioca, farinha de mandioca, farofa, cuscuz, tapioca, aveia, pão francês, pão de forma, torrada, biscoito sem recheio doce e salgado, biscoito recheado, biscoito amanteigado, waffer, bolo simples, bolo recheado.
	<b>Controle</b>	88,7	
<b>Hortaliças</b>	<b>Caso</b>	96,4	Alface, tomate, cenoura, outros legumes (abobrinha, berinjela, chuchu, pepino), outras verduras cruas (acelga, rúcula, agrião), outras verduras cozidas (acelga, espinafre, escarola, couve), brócolis, couve-flor e repolho.
	<b>Controle</b>	92,6	
<b>Frutas</b>	<b>Caso</b>	82,5	Laranja, mexerica, abacaxi, banana, maçã, pêra, melão, melancia, mamão, goiaba, abacate, suco natural.
	<b>Controle</b>	73,1	
<b>Industrializados</b>	<b>Caso</b>	79	Maionese, condimentos, molho para salada, patê, chantilly, suco industrializado, refrigerante comum, diet e light, hambúrguer, nuggets, almondegas.
	<b>Controle</b>	65,7	
<b>Infusão</b>	<b>Caso</b>	60	Chá e café sem açúcar, chá e café com açúcar.
	<b>Controle</b>	65	
<b>Bebida alcoólica</b>	<b>Caso</b>	30	Cerveja.
	<b>Controle</b>	45	
<b>Óleos e gorduras</b>	<b>Caso</b>	61,6	Óleo, azeite, vinagre, manteiga ou margarina comum, manteiga ou margarina light.
	<b>Controle</b>	61,6	
<b>Lanches</b>	<b>Caso</b>	78,3	Salgados fritos, salgados assados, sanduíche.
	<b>Controle</b>	83,3	
<b>Ácúcar e doces</b>	<b>Caso</b>	65	Chocolate, bombom, brigadeiro, chocolate em pó, sobremesas, doces, tortas e pudins, açúcar, mel, geléia
	<b>Controle</b>	88,8	

Todos os indivíduos da pesquisa foram avaliados quanto a ingestão dietética. Os dados dietéticos obtidos foram traduzidos em energia, macro e micronutrientes (Tabela 12). Observa-se com base nos resultados estatísticos que não houve variação significativa no consumo alimentar das mulheres estudadas, tendo sido semelhante entre os grupos caso e controle. Além disso, ao realizar-se o teste t, comparando as médias de consumo dos macronutrientes carboidratos, proteínas, lipídios e fibras com as variáveis desfecho (mulheres obesas x mulheres eutróficas), também não foram observadas associações estatisticamente significantes.

Analisando a razão de ingestão *quilocalorias/quilograma de peso corporal* tem-se que o grupo caso teve média de ingestão energética de 19,9 kcal/kg/dia, e o grupo controle 27,9 kcal/kg/dia (Tabela 13). O grupo controle, evidenciou consumo compatível para a manutenção do seu peso (faixa de recomendação: 25-30 kcal/kg/dia), enquanto o grupo caso apresentou um nível médio de ingestão abaixo do valor de manutenção, a ingestão energética foi 20,4% menor do que a recomendação, considerando-se o limite inferior de 25 kcal/kg/dia.

Outra razão de ingestão, *gramas de proteínas/quilograma de peso corporal*, é utilizada para cálculo e recomendação de consumo protéico sem prejuízo da função renal (recomendação de ingestão: 0,6 a 0,8 g de proteínas/kg de peso/dia). O grupo controle, apresentou ingestão protéica acima do recomendado, 1,2 g de proteínas/kg de peso/dia, enquanto o grupo caso, apresentou um nível médio de consumo compatível com a recomendação, 0,78 g de proteínas/kg de peso/dia apresentando-se no limite máximo preconizado (Tabela 13).

**Tabela 12** – Análise de consumo de energia e nutrientes da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

Variáveis	Grupo	Média de consumo	Desvio Padrão	IC 95%	P*
Energia/dia (kcal)	Caso	1857,1	936,22	(1374.01 – 2058.69)	0.93
	Controle	1692	983,34	(1204.38 – 2178.22)	
Carboidrato/dia (g)	Caso	243,45	168,26	(167.06 – 257.87)	0.90
	Controle	207,85	109,97	(154.02 – 262.94)	
Gordura total/dia (g)	Caso	65,8	27,6	(52.05 – 79.26)	0.86
	Controle	62,7	47,14	(39.98 – 86.73)	
Gordura polinsaturada/dia (g)	Caso	7,95	4,16	(6.17 – 9.37)	0.48
	Controle	8,5	6,75	(5.75 – 12.37)	
Gordura monoinsaturada/dia (g)	Caso	20,6	9,25	(16.40 – 25.53)	0.59
	Controle	18,2	15,98	(10.77 – 26.51)	
Gordura saturada/dia (g)	Caso	21,85	11,49	(16.70 – 28.08)	0.75
	Controle	20,4	16,98	(12.39 – 29.24)	
Proteína/dia (g)	Caso	73,55	35,08	(55.31 – 89.05)	0.91
	Controle	72,85	49,85	(49.14 – 98.49)	
Fibra total/dia (g)	Caso	16,8	9,02	(12.47 – 19.53)	0.27
	Controle	12,65	7,65	(9.44 – 16.99)	
Fibra solúvel/dia (g)	Caso	4	3,32	(2.73 – 5.63)	0.29
	Controle	2,85	2,3	(2.15 – 4.37)	
Fibra insolúvel/dia (g)	Caso	5,6	3,91	(4.04 – 7.03)	0.25
	Controle	3,95	2,32	(3.38 – 5.62)	
Colesterol/dia (g)	Caso	236,35	139,65	(171.27 – 308.77)	0.77
	Controle	261,05	267,90	(127.80 – 393.13)	
Vitamina A/dia (UI)	Caso	958,85	555,38	(704.51 – 1249.04)	0.55
	Controle	872	470,33	(642.31 – 1108.01)	
Vitamina C/dia (mg)	Caso	210,5	188,57	(110.25 – 291.52)	0.11
	Controle	120,35	87,52	(79.36 – 165.65)	
Vitamina B1/dia (mg)	Caso	1,3	1,17	(1.31 – 2.04)	0.72
	Controle	1,3	1,66	(1.04 – 2.60)	
Vitamina B2/dia (mg)	Caso	0,8	0,83	(1.07 – 1.74)	0.79
	Controle	1,05	0,89	(1.03 – 1.93)	

**Tabela 12** – Análise de consumo de energia e nutrientes da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

(Continuação)

Variáveis	Grupo	Média de consumo	Desvio Padrão	IC 95%	P*
Vitamina B6/dia (ug)	Caso	1,10	1,02	(1.21 – 1.97)	0.85
	Controle	1,05	0,88	(1.10 – 1.97)	
Vitamina B12/dia (ug)	Caso	3,8	2,53	(3.09 – 5.62)	0.96
	Controle	3,85	2,85	(3.02 – 5.78)	
Vitamina D/dia (mg)	Caso	9,15	16,20	(2.11 – 18.03)	0.12
	Controle	23	33,57	(7.33 – 40.61)	
Niacina/dia (mg)	Caso	19	10,05	(14.02 – 21.91)	0.59
	Controle	19,3	13,03	(13.39 – 26.41)	
Folato/dia (mg)	Caso	240,10	116,21	(177.58 – 283.51)	0.54
	Controle	204,95	121,17	(147.08 – 266.84)	
Ácido pantotênico/dia (mg)	Caso	3,5	2,16	(2.92 – 4.43)	0.74
	Controle	2,9	2,51	(2.20 – 4.69)	
Vitamina E/dia (mg)	Caso	11,55	6,51	(8.94 – 13.09)	0.79
	Controle	9,9	6,25	(7.38 – 13.68)	
Iodo/dia (mg)	Caso	54,7	49,84	(32.06 – 80.98)	0.49
	Controle	45,15	36,74	(28.14 – 64.39)	
Sódio/dia (mg)	Caso	2302,85	1597,24	(1558.16 – 2462.61)	0.99
	Controle	2017,15	1482,54	(1276.47 – 2744.46)	
Cálcio/dia (mg)	Caso	690,45	423,53	(476.27 – 895.02)	0.68
	Controle	626,45	339,92	(463.73 – 799.73)	
Magnésio/dia (mg)	Caso	232,5	103,39	(178.18 – 259.95)	0.44
	Controle	194,7	94,52	(148.88 – 242.55)	
Zinco/dia (mg)	Caso	8,5	5,23	(6.17 – 11.15)	0.86
	Controle	7,8	4,76	(6.03 – 10.68)	
Manganês/dia (mg)	Caso	6	8,5	(2.06 – 10.45)	0.64
	Controle	10,95	20,19	(1.48 – 14.46)	
Potássio/dia (mg)	Caso	2719,55	1170,73	(2084.08 – 3131.423)	0.29
	Controle	2206,85	1158,74	(1644.15 – 2790.85)	
Fósforo/dia (mg)	Caso	975,4	441,88	(736.98 – 1151.535)	0.86
	Controle	908,5	569,39	(633.79 – 1196.89)	

**Tabela 12** – Análise de consumo de energia e nutrientes da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

(Continuação)

Variáveis	Grupo	Média de consumo	Desvio Padrão	IC 95%	P*
Ferro/dia (mg)	Caso	13,7	8,59	(9.96 – 15.38)	0.69
	Controle	11,45	6,16	(8.85 – 14.92)	
Cobre/dia (mg)	Caso	1	0,917	(1 – 1.67)	0.90
	Controle	0,85	1,09	(0.94 – 1.67)	
Selênio/dia (ug)	Caso	334,75	218,54	(232.51 – 447.77)	0.68
	Controle	400	584,4	(111.79 – 690.57)	

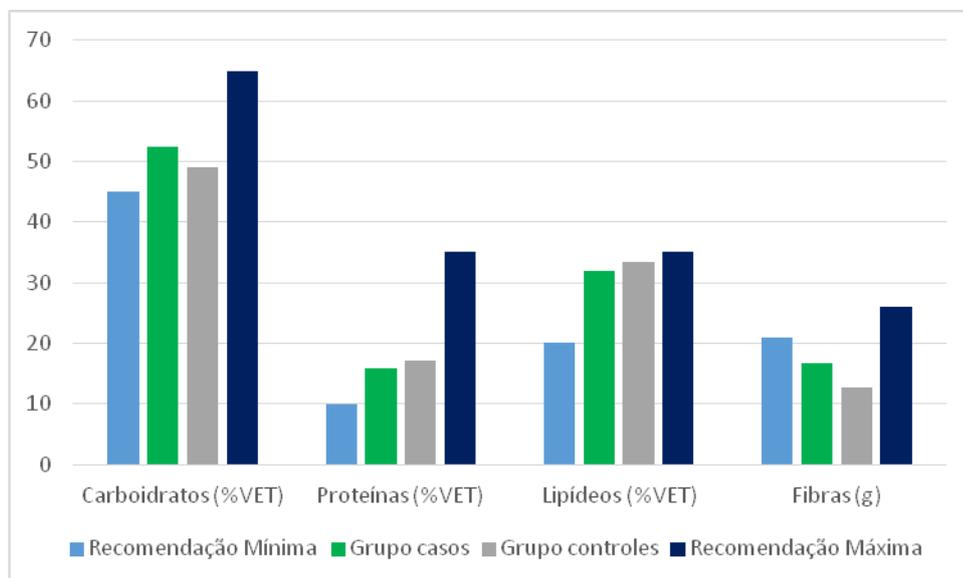
Nota: \*significância estatística quando p-valor  $\leq 0,05$

**Tabela 13** – Comparação das variáveis dietéticas relacionadas às razões de ingestão e Valor Energético Total (VET) da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

Variáveis	Grupo Caso	Grupo controle
Energia (Kcal)	1857,1	1692
Kcal/kg/dia	19,9	27,9
Carboidrato (g)	243,45	207,85
Carboidrato (%VET)	52,41	49,13
Proteína (g)	73,55	72,85
Gramas de proteína/kg/dia	0,78	1,2
Proteína (%VET)	15,84	17,22
Lípido (g)	65,8	62,7
Lípido (% VET)	31,88	33,35

A partir de dados de média de ingestão de macronutrientes, comparou-se a porcentagem que cada um deles, carboidratos, proteínas e lipídeos (Tabela 13), representa no Valor Energético total (VET) ingerido, com o intervalo de balanceamento dietético proposto pelas *Dietary References Intake* (DRI). Assim, tem-se que os grupos caso e controle balancearam suas dietas conforme o intervalo de distribuição energética recomendado, visualizado na figura 5. Em relação ao consumo de fibras, foi observado que ambos os grupos apresentaram um consumo inferior ao *Adequate Intake* (AI), com consumo de 16,8% e 12,65% para os grupos caso e controle, respectivamente. Em relação ao consumo de lipídios, o consumo de gordura saturada, mostrou-se maior que os 7% recomendado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) em consonância com a *National Heart Lung e Blood Institute* dos Estados Unidos, tanto no grupo caso, quanto no grupo controle, de 10,58% e 10,85%, respectivamente.

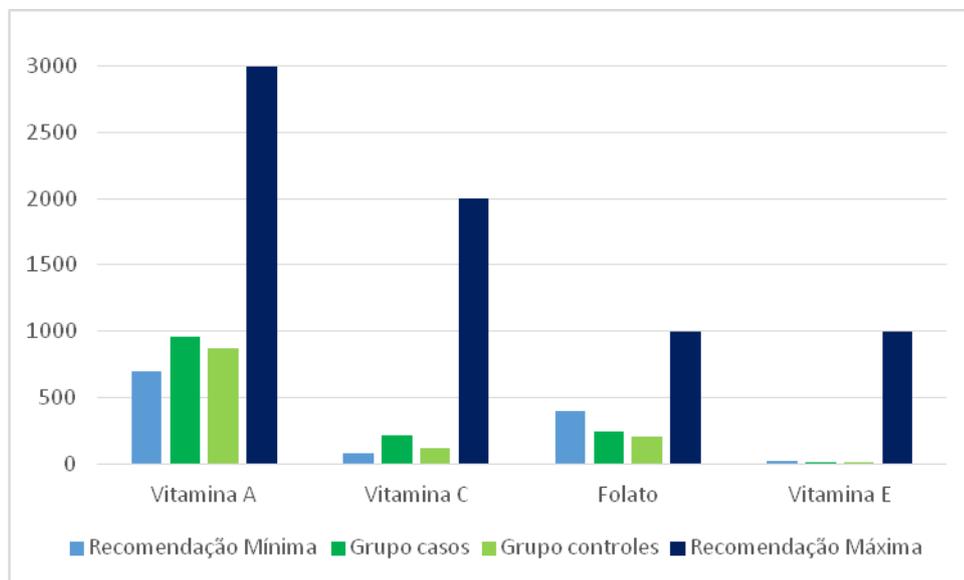
**Figura 5** – Comparação entre as médias de consumo de macronutrientes dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI), e AI (*Adequate Intake*) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.



Legenda – A recomendação de consumo de macronutrientes para tal faixa etária é para Carboidratos: 45 a 65% do VET (Valor Energético Total); Proteínas: 10 a 35% do VET; Lipídeos: 20 a 35% do VET e Fibras: 21 a 26 gramas/dia.

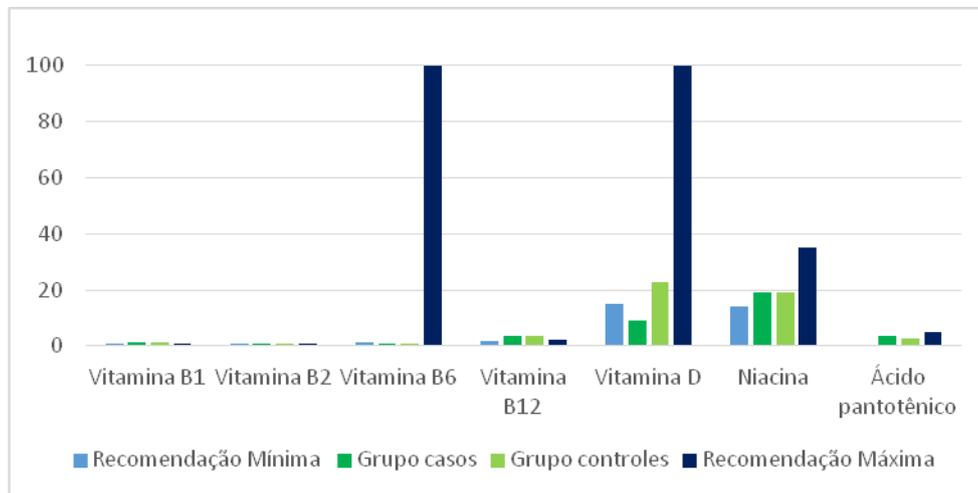
A comparação da média da ingestão das vitaminas A, C, E e folato, dos grupos caso e controle com as recomendações de ingestão mostrou que a média de consumo dos grupos foi semelhante e de acordo com a recomendação, exceto para folato e vitamina E, em que ambos os grupos mostraram médias de ingestão abaixo do recomendado (Figura 6).

**Figura 6** – Comparação entre as médias de consumo das Vitaminas A, C, E e folato dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI), e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.



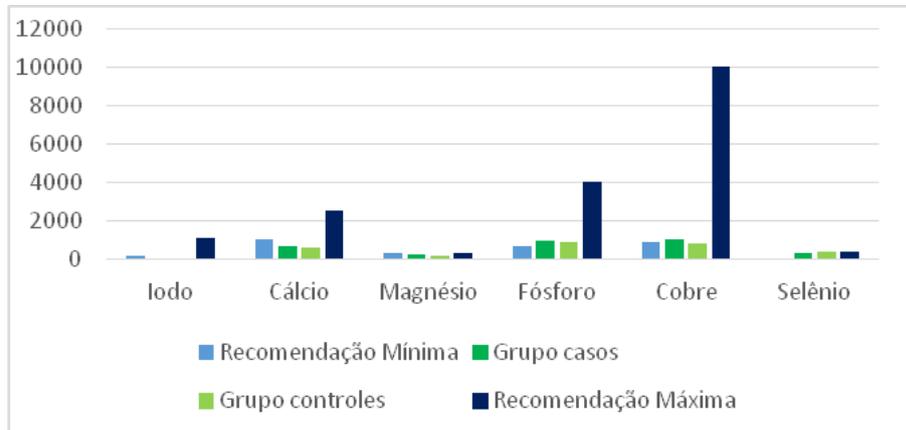
A comparação da média das ingestões das Vitaminas B1, B2, B6, B12, D, Niacina e Ácido pantotênico dos grupos caso e controle com as recomendações de ingestão demonstrou que a média de consumo em relação às vitaminas B1 e B12, estavam acima do recomendado nos dois grupos. As vitaminas B6 e ácido pantotênico apresentaram ingestão inferior ao preconizado nos grupos caso e controle. Ambos os grupos estudados apresentaram consumo em concordância com as recomendações em relação à niacina. No entanto, as vitaminas B2 e D apresentaram consumo pelo grupo caso, inferior enquanto o grupo controle apresentou-se de acordo com a recomendação (Figura 7).

**Figura 7** – Comparação entre as médias de consumo das Vitaminas B1, B2, B6, B12, D, Niacina e Ácido pantotênico dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI), e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.



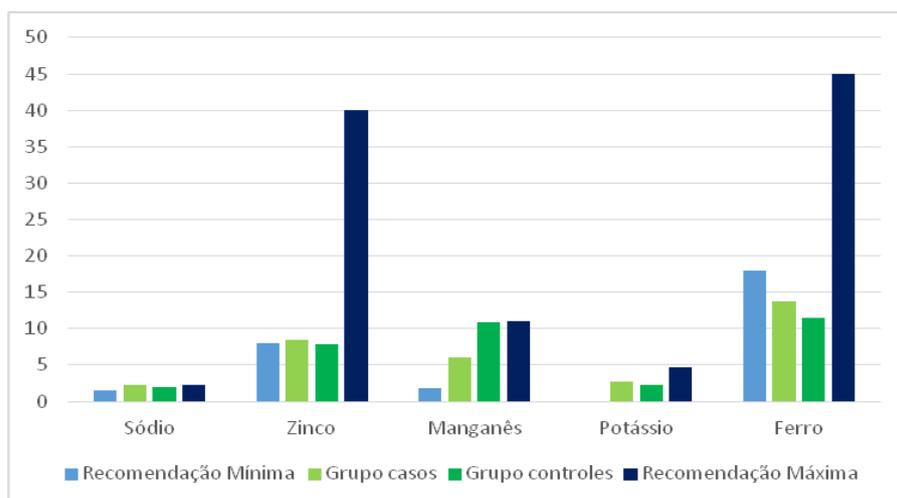
Para os minerais fósforo e selênio, a ingestão dos grupos Caso e Controle também foi adequada. Exceto para iodo, cálcio e magnésio que tiveram a ingestão menor que a recomendação, e o cobre que apresentou uma ingestão inferior ao preconizado no grupo controle enquanto o grupo caso demonstrou uma ingestão adequada, dentro dos limites de recomendação (Figura 8).

**Figura 8** – Comparação entre as médias de consumo de Sais Minerais dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI),e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.



Para os minerais e nutrientes sódio, manganês e potássio, a ingestão dos grupos Caso e Controle foi adequada. Exceto para ferro que apresentou ingestão menor que a recomendação, e o zinco que apresentou ingestão um pouco inferior ao preconizado no grupo controle enquanto o grupo caso demonstrou ingestão adequada, dentro dos limites de recomendação (Figura 9).

**Figura 9** – Comparação entre as médias de consumo de Sais Minerais e outros nutrientes dos Grupos Caso e Controle com a Faixa de Distribuição Aceitável de macronutrientes (AMDR/DRI),e AI (Adequate Intake) para a faixa etária de 20 a 70 anos. São Paulo, SP, 2013-2014.



### **5.2.2 Avaliação antropométrica do estado nutricional**

Os resultados da avaliação antropométrica estão apresentados na tabela 14. Foi observado que as mulheres estudadas do grupo caso apresentaram média de IMC (Índice de massa corporal) de 36,5 kg/m<sup>2</sup> (DP: 4,41; Amplitude: 30,6-44,9). Ao classificar as pacientes em classes de obesidade de acordo com os critérios determinados pela OMS (Organização Mundial de Saúde) (1995), verificou-se que nove (45%) das mulheres apresentam obesidade grau I (IMC 30-34,99 kg/m<sup>2</sup>), sete (35%) apresentam obesidade grau II (IMC 35-39,99 kg/m<sup>2</sup>) e quatro (20%) das mulheres apresentam obesidade grau III (IMC ≥ 40 kg/m<sup>2</sup>). As mulheres do grupo controle apresentaram IMC médio de 22,4 kg/m<sup>2</sup> (DP: 2,04; Amplitude: 18,8-24,9).

Em relação ao percentual de gordura, observou-se a média de 45,35% (DP: 5,18; Amplitude: 35,4-53,4) de gordura corporal no grupo caso e 30,04% (DP: 6,71; Amplitude: 11,3-40,4) no grupo controle indicando, um excesso de gordura corporal em ambos os grupos de acordo com LOHMAN (1992). Em relação à essa classificação, no grupo caso todas as mulheres apresentam riscos de doenças associadas à obesidade, apresentando um percentual de gordura corporal maior que 32%. Das mulheres do grupo controle, 2 (10%) apresentaram-se abaixo da média, 1 (5%) na média, 8 (40%) acima da média e 9 (45%) apresentaram risco de desenvolvimento de doenças relacionadas com a obesidade.

A avaliação da Razão cintura-quadril (RCQ), importante indicador de obesidade central. Comparando-se os resultados obtidos com o ponto de corte recomendado pela OMS (Organização Mundial de Saúde, 1995), de 0,85 para mulheres, observou-se que todas as pacientes avaliadas do grupo caso apresentaram-se acima do recomendado com a média de RCQ de 0,99 (DP: 0,074; Amplitude: 0,87-1,19), enquanto as mulheres do grupo controle apresentaram uma razão média de 0,83 (DP: 0,047; Amplitude: 0,77-0,96), onde sete (35%) mulheres apresentaram a RCQ acima do valor referência preconizado pela OMS. No entanto, ao avaliar a Razão cintura quadril de acordo com os pontos de corte propostos por LOHMAN et al (1988), em relação ao risco de desenvolvimento de doenças associadas à Síndrome Metabólica (Doenças cardiovasculares, hipertensão, dislipidemia e alteração no metabolismo de carboidratos) os resultados demonstraram que em relação ao grupo caso 18 (90%) das mulheres apresentaram alto risco para o desenvolvimento dessas doenças, enquanto 2 (10%) apresentaram risco moderado.

Em relação ao grupo controle, foi observado que 3 (15%) não apresentaram riscos, 13 (65%) apresentaram baixo risco, 1(5%) apresentou risco moderado e 3 (15%), apresentaram alto risco para o desenvolvimento dessas doenças.

**Tabela 14 – Comparação de variáveis antropométricas da população estudada.**

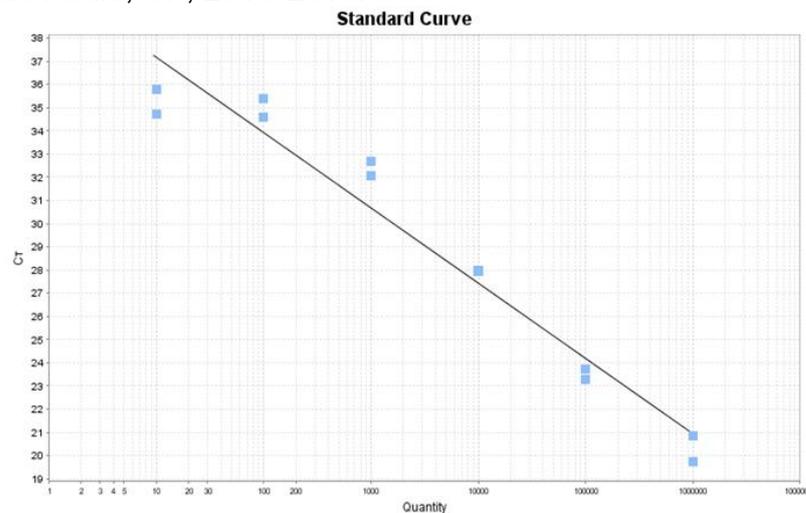
<b>Variáveis</b>	<b>Grupo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Peso (kg)</b>	<b>Caso</b>	93,29	10,5	75,74	107,5
	<b>Controle</b>	60,54	7,87	45,75	74,22
<b>Estatura (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Caso</b>	1,60	0,07	1,49	1,72
	<b>Controle</b>	1,64	0,07	1,51	1,8
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Caso</b>	36,45	4,52	30,6	44,9
	<b>Controle</b>	22,41	2,04	18,8	24,9
<b>Razão cintura-quadril (RCQ)</b>	<b>Caso</b>	0,99	0,07	0,88	1,19
	<b>Controle</b>	0,83	0,05	0,77	0,96
<b>Gordura corporal total (%)</b>	<b>Caso</b>	45,35	5,19	35,4	53,1
	<b>Controle</b>	30,035	6,71	11,3	40,4

### 5.3 Determinação da microbiota intestinal

#### 5.3.1 Padronização de reação de PCR quantitativo (qPCR) por meio de TaqMan para a detecção de *Mollicutes*

Pela qPCR quantificou-se carga de *Mollicutes* representadas por unidades formadoras de colônias (UFC/ $\mu$ l) nas amostras de fezes. O ensaio de qPCR demonstrou eficiência de reação de E= 103,3% ( $r^2= 0,95$ ). A sensibilidade do teste foi de detecção de no mínimo dez cópias de genoma/reacção quando utilizados os padrões de número de cópias de DNA genômico diluído (Figura 10).

**Figura 10** – Curva-padrão gerada a partir dos pontos de Ct obtidos com o gráfico de amplificação de diluições seriadas do controle positivo *Mycoplasma hominis* calculado pelo software StepOne 2.1 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). São Paulo, SP, 2013-2014.



A repetibilidade testada por meio dos testes intra-ensaio e inter-ensaio da qPCR está apresentada na tabela 15. O ensaio foi específico para *Mollicutes*, não tendo sido visualizada amplificação dos controles microbianos de outros microorganismos utilizados.

**Tabela 15** – Repetibilidade intra-ensaio e inter-ensaio da qPCR para *Mollicutes*. São Paulo, SP, 2013-2014.

Nº de cópias do Genoma	Repetibilidade intra-ensaio		Repetibilidade inter-ensaio	
	Genoma bacteriano diluído em 1x TE		Genoma bacteriano diluído em 1x TE	
	Ponto médio de corte (C <sub>t</sub> ± SD)	CV (%)	Ponto médio de corte (C <sub>t</sub> ± SD)	CV (%)
10	35.37 ± 0.15	0.45	34.94 ± 0.45	1.29
10 <sup>2</sup>	34.25 ± 0.17	0.50	33.79 ± 0.29	0.87
10 <sup>3</sup>	30.99 ± 0.21	0.70	30.74 ± 0.39	1.28
10 <sup>4</sup>	27.39 ± 0.23	0.84	27.39 ± 0.38	1.42
10 <sup>5</sup>	23.56 ± 0.12	0.54	22.91 ± 0.25	1.10
10 <sup>6</sup>	18.74 ± 0.66	3.52	19.15 ± 0.77	4.03

CV, coeficiente de variação.

A PCR genérica para *Mollicutes* foi positiva em 17 (85%) das amostras clínicas do grupo caso e 8 (40%) das amostras do grupo controle obtidas. No entanto, nem todas as amostras positivas em cPCR para *Mollicutes* foram positivas em qPCR, 13 (65%) das amostras do grupo caso e três (15%) do grupo controle foram positivas em qPCR (Tabela 16).

**Tabela 16** – Comparação entre os resultados obtidos no teste de sensibilidade pelas técnicas de PCR convencional e qPCR, para detecção de *Mollicutes*. São Paulo, SP, 2013-2014.

Amostra	Grupo	PCR convencional	qPCR
		n (%)	n (%)
Positiva <sup>a</sup>	Caso	17 (85%)	13 (65%)
Negativa <sup>b</sup>		3 (15%)	7 (35%)
Positiva <sup>a</sup>	Controle	8 (40%)	3 (15%)
Negativa <sup>b</sup>		12 (60%)	17 (85%)

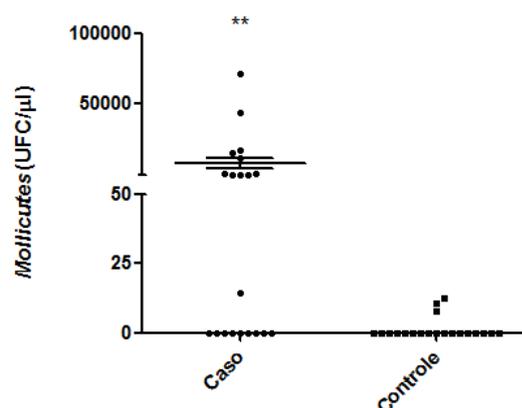
Nota: n= 20 mulheres

<sup>a</sup>Positiva - Detecção de produto de DNA esperado

<sup>b</sup>Negativa - Ausência de produto de DNA esperado.

Por meio da PCR em tempo real foi possível quantificar o DNA e consequentemente a carga do microrganismo representada por unidades formadoras de colônias - ufc/ $\mu$ l nas amostras de fezes coletadas. Os resultados da qPCR, demonstraram uma carga média de *Mollicutes* nas amostras de fezes analisadas referentes ao grupo caso de  $5,84 \times 10^3$  ufc/ $\mu$ l e de 1,56 ufc/ $\mu$ l referentes ao grupo controle. Observa-se na figura 11, gráfico de dispersão referente às cargas médias das amostras positivas, com detecções de aproximadamente  $10^1$  a  $10^3$  UFC/ml de *Mollicutes*. Contudo, as médias das dosagens, foram maiores nas mulheres do grupo caso. E após análise estatística por Mann-Whitney foi possível observar diferença estatisticamente significativa para a espécie *Mollicutes* ( $p = 0,0023$ ). Em seguida, foi testada através do teste de *Odds Ratio*, a associação epidemiológica entre as variáveis desfecho (mulheres obesas x mulheres eutróficas) e as variáveis *Mollicutes* (presença x ausência), tendo sido detectada uma associação positiva estatisticamente significativa entre a presença de *Mollicutes* e mulheres obesas (O.R.= 11,5; I.C.= 2,42-55,4). Além disso, ao realizar-se o teste t, comparando as médias de consumo dos macronutrientes carboidratos, proteínas, lipídios e fibras com as variáveis *Mollicutes* (presença x ausência), não foram observadas associações estatisticamente significantes.

**Figura 11** - Quantificação por qPCR, de *Mollicutes* (UFC/ $\mu$ l) a partir das amostras de fezes, nos grupos caso e controle. São Paulo, SP, 2013-2014.

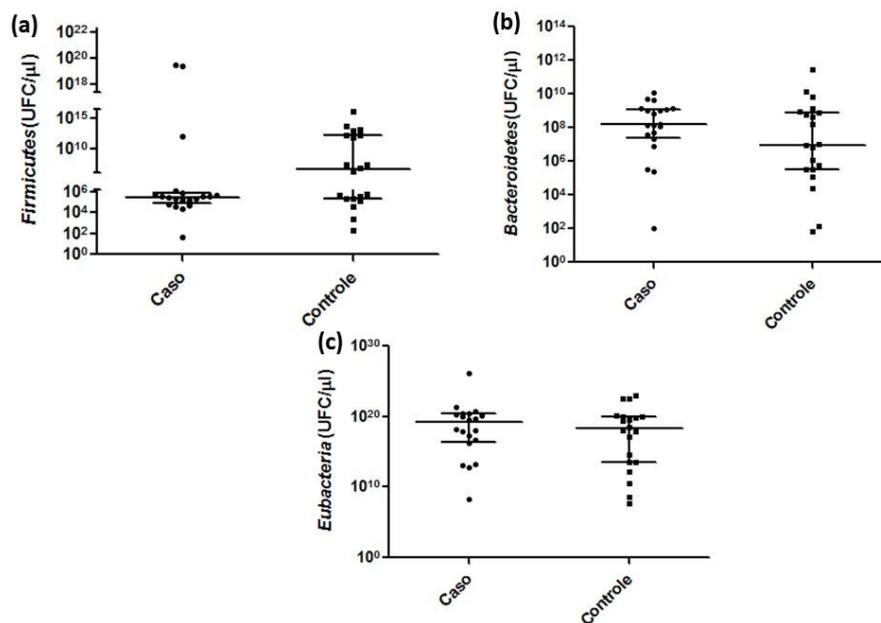


**Legenda** – Concentração média de *Mollicutes* entre as mulheres do grupo caso ( $\sim 5,84 \times 10^3$  UFC/ $\mu$ L) e controle ( $\sim 1,56$  UFC/ $\mu$ L) estudadas e positivas para *Mollicutes* pelo qPCR (\*\*p-valor=0,0023). Mediana e desvio padrão, indicadas por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística realizada por Mann Whitney, assumindo p-valor  $\leq 0,05$ .

### 5.3.2 Detecção de micro-organismos dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, além de bactérias totais (Eubacterias) por PCR em tempo Real (qPCR)

Todas as amostras 40 (100%) foram positivas para *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, na qPCR tanto para o grupo caso como para o controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para as cargas de *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e Bactérias totais entre as mulheres do grupo caso e controle. No entanto as cargas médias de *Firmicutes* e *Eubactérias* no grupo caso, foram maiores que no grupo controle, enquanto *Bacteroidetes* apresentou uma maior carga no grupo controle. A figura 12 representa os gráficos de dispersão referentes às cargas médias das amostras de fezes para esses micro-organismos.

**Figura 12** - Quantificação por qPCR, de *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Eubacterias* (UFC/μl) a partir das amostras de fezes, nos grupos caso e controle. São Paulo, SP, 2013-2014



**Legenda** – (a) Concentração de Firmicutes (UFC/μL) entre as mulheres do grupo caso ( $\sim 8,69 \times 10^{18}$  UFC/μl) e controle ( $\sim 5,04 \times 10^{14}$  UFC/μl). (b) Concentração de Bacteroidetes (UFC/μL) entre as mulheres do grupo caso ( $\sim 8,79 \times 10^8$  UFC/μl) e controle ( $\sim 1,46 \times 10^9$  UFC/μl). (c) Concentração de Eubacterias (UFC/μL) entre as mulheres do grupo caso ( $\sim 7,31 \times 10^{24}$  UFC/μl) e controle ( $\sim 6,19 \times 10^{21}$  UFC/μl). Mediana e amplitude interquartílica, indicadas por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística realizada por Mann Whitney, assumindo p-valor  $\leq 0,05$ .

Com o intuito de verificar o percentual de micro-organismos da classe *Mollicutes* frente à carga média de *Firmicutes*, foi realizada a análise do percentual médio dos referidos micro-organismos, onde verificou-se que *Mollicutes* representam 4.24% do número médio de *Firmicutes* detectados na qPCR específica para o mesmo nas amostras analisadas no grupo caso e  $2,5 \times 10^{-4}\%$  no grupo controle (Tabela 17).

**Tabela 17** – Número médio de cópias e percentual dos grupos *Mollicutes* estudados frente ao Filo *Firmicutes* na população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

Grupo	<i>Firmicutes</i>	<i>Mollicutes</i>	
	Média cópias/ g de fezes*	Média cópias/ g de fezes*	%**
<b>Caso</b>	$8,69 \times 10^{18}$	$5,84 \times 10^3$	4,24
<b>Controle</b>	$5,04 \times 10^{14}$	1,6	$2,5 \times 10^{-4}$

Nota: \* Média de cópias/grama de fezes

\*\* Percentual de cópias de *Mollicutes* em relação ao Filo *Firmicutes*

Os resultados da qPCR, demonstraram carga média de Bactérias totais (*Eubactérias*) nas amostras de fezes analisadas do grupo caso ( $\sim 7,31 \times 10^{24}$  UFC/ $\mu$ l) e controle ( $\sim 6,19 \times 10^{21}$  UFC/ $\mu$ l). As análises de percentual entre a carga média de *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Mollicutes* e a carga média de bactérias totais estão representadas na Tabela 18.

**Tabela 18** – Número médio de cópias e percentual dos grupos de bacterianos estudados frente às bactérias totais na população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

Grupo	Bactérias totais	<i>Firmicutes</i>		<i>Bacteroidetes</i>		<i>Mollicutes</i>	
	Média cópias/ g de fezes*	Média cópias/ g de fezes*	%**	Média cópias/ g de fezes*	%**	Média cópias/ g de fezes*	%**
<b>Caso</b>	$7,31 \times 10^{24}$	$8,69 \times 10^{18}$	$4,42 \times 10^5$	$8,79 \times 10^8$	$7,18 \times 10^{-2}$	$5,84 \times 10^3$	$2,8 \times 10^{-2}$
<b>Controle</b>	$6,19 \times 10^{21}$	$5,04 \times 10^{14}$	$1,71 \times 10^5$	$1,46 \times 10^9$	$6,24 \times 10^2$	1,6	$2,2 \times 10^{-11}$

Nota: \* Média de cópias/grama de fezes

\*\* Percentual de cópias de cada bactéria em relação às bactérias totais

Foi calculada a proporção de *Firmicutes* em relação aos *Bacteroidetes* na microbiota intestinal das mulheres estudadas, tendo sido observada maior proporção na microbiota intestinal das mulheres obesas em relação às eutróficas do grupo controle (Tabela 19). A relação entre o percentual de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal das mulheres do grupo caso foi cerca de  $2,9 \times 10^7\%$  maior entre as mulheres obesas do grupo caso em comparação com o grupo controle.

**Tabela 19** – Proporção de *Firmicutes* em relação à *Bacteroidetes* na população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

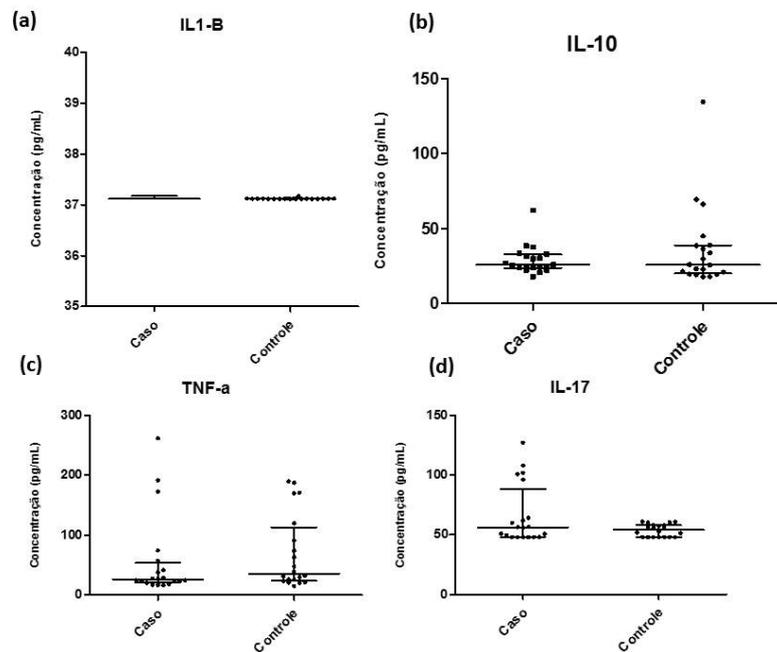
Grupo	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	Proporção <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>
	Média cópias/ g de fezes*	Média cópias/ g de fezes*	Média cópias/ g de fezes*
<b>Caso</b>	$8,69 \times 10^{18}$	$8,79 \times 10^8$	$1,34 \times 10^{13}$
<b>Controle</b>	$5,04 \times 10^{14}$	$1,46 \times 10^9$	$4,5 \times 10^5$

Nota: \* Média de cópias/grama de fezes

#### 5.4 Dosagem de citocinas do soro sanguíneo

Ao serem quantificadas as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, IL17-A e TNF- $\alpha$  pela técnica de ELISA, no plasma sanguíneo das mulheres, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle para nenhuma das citocinas avaliadas IL-1 $\beta$  ( $p= 0,2249$ ), IL-10 ( $p=1$ ), IL17-A ( $p=0,3169$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,2235$ ) (Figura 13).

**Figura 13** – Quantificação de IL-1 $\beta$ , IL-10, IL17-A e TNF- $\alpha$  (pg/mL) no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos caso e controle da população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.



**Legenda-** (a) Concentração de IL-1 $\beta$  (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres casos e controles (b) Concentração de IL-10 (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres casos e controles. (c) Concentração de TNF- $\alpha$  (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres casos e controles. (d) Concentração de IL17-A (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres casos e controles. Desvio padrão e média indicados por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística por Mann Whitney;  $p < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo que desempenha um importante papel na gênese da obesidade, associada com o desenvolvimento das respostas imunológicas, além do estado nutricional do hospedeiro. Projetos mundiais de pesquisa estão em desenvolvimento para compreender esta complexidade microbiana na saúde humana (SHETTY et al., 2013). O presente estudo avaliou a participação dos micro-organismos da Classe *Mollicutes* e dos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal de mulheres obesas e eutróficas.

Na diversidade das populações humanas e a ocorrência da obesidade é importante estudar a distribuição da microbiota intestinal fazendo-se necessário e imprescindível, a caracterização da população estudada em relação à preditores importantes associados com a obesidade, microbiota intestinal e ambiente (KALLIOMAKI et al., 2008; PENDERS et al., 2006). No presente estudo, observou-se variação estatística em relação à variável gestação, onde 14 (70%) das mulheres do grupo caso e 2 (10%) do controle relataram já terem tido filhos. Aagaard et al. (2012), verificaram que o microbioma era semelhante em mulheres grávidas ou não. No entanto as mulheres grávidas apresentaram microbioma menos diversificado. Sugeriu-se, que entre as mulheres em idade reprodutiva, o microbioma permanece como uma comunidade dinâmica na vida reprodutiva do adulto, e que a estrutura da comunidade não-grávida pode retornar em alguma medida nas últimas semanas de gestação. Além disso, alguns autores têm sugerido que o acúmulo de gordura corporal na obesidade pode acarretar várias consequências à saúde, como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, dispnéia, câncer, dislipidemia, doenças cardíacas, doenças hepatobiliares, osteoartrite, alterações gastrintestinais e distúrbios psicossociais, o que corrobora com os achados em relação à história clínica das mulheres estudadas (FRANCISCHI et al., 2000; PEREIRA et al., 2003; SILVA, 2005).

Para as mulheres, em especial, a menopausa tem sido associada como colaboradora para o desenvolvimento de obesidade e acúmulo de gordura corporal. (SOWERS et al., 2007). No presente estudo, encontraram-se diferenças estatísticas em relação à variável menopausa, onde 9 (45%) das mulheres obesas do grupo caso e 3 (15%) das mulheres do grupo controle relataram ter entrado na

menopausa. Entretanto, Sternfeld et al. (2004), em estudo de coorte feminina entre 42-52 anos de idade, nos EUA, não encontraram associação entre a menopausa e o aumento de circunferência da cintura, bem como aumento do peso, dessa forma, sugerindo que somente um fator pode não ser o responsável pelo desenvolvimento de obesidade. No presente trabalho, observou-se que 75% das mulheres do grupo caso e 50% do grupo controle, nasceram de parto normal. Tem sido evidenciado na literatura que o tipo de parto pode interferir na composição da microbiota pela forma de colonização do recém-nascido. O parto via cesariana aumentaria o risco de obesidade em relação ao parto normal (HUH et al, 2012; PEI et al., 2014). Nesse sentido, Ajslev et al. (2011), em estudo longitudinal prospectivo na infância, com acompanhamento até os sete anos, observaram que uma combinação de exposições precoces, que inclui o tipo de parto, o IMC materno pré-gestacional, e uso de antibióticos na primeira infância (<6 meses), influenciaram o risco de excesso de peso.

Existem diversos estudos em relação aos fatores dietéticos e a gênese da obesidade (DAILEY, 2014; ISOMAA et al., 2001; MORENO-INDIAS et al., 2014; PEREIRA et al., 2002; ROMERO; ZANESCO, 2006; SANTOS et al., 2006). No entanto, no presente estudo, o valor energético encontrado em relação ao grupo caso, ao analisar-se a razão *quilocalorias/quilograma de peso corporal*, foi inferior à recomendação, caracterizando alimentação insuficiente em energia (WHO, 2003). Da mesma maneira que no presente estudo, Pereira et al. (2012) não encontraram diferenças significativas entre o consumo energético entre indivíduos eutróficos e obesos. Souza et al. (2010) estudaram a ingestão alimentar e balanço energético da população adulta de Niterói- RJ e encontraram que a ingestão energética mostrou-se decrescente com o aumento do IMC para as mulheres. A ingestão energética em menor quantidade parece indicar que embora o corpo esteja obeso, os tecidos vitais são inadequadamente nutridos pois a alimentação insuficiente fornece poucos nutrientes (HUTSON et al. 1965). Sawaya et al. (2003) em estudo com mulheres realizado em Maceió, também observaram que a ingestão energética entre os grupos eutrófico e obesos não apresentou diferença significativa. Em outro estudo com mulheres no Rio Grande do Sul, também foi verificado que o consumo alimentar energético não apresentou diferença significativa ( $p=0,157$ ) entre os grupos (baixo peso, eutrófico e excesso de peso/obesidade) (FRANKE et al., 2007). Com isto,

provavelmente a ingestão energética não seja a causa da obesidade nas mulheres estudadas, sendo que a baixa ingestão aliada a algumas deficiências nutricionais e predisposição genética, possa criar mecanismos de adaptação, levando a um ciclo metabólico, cujo o desfecho seja o armazenamento de gordura na região abdominal (BALAMURUGAN et al., 2010; CANI; DELZENNE, 2009; DAVID et al., 2014; HANSON et al., 2009; JIMENEZ; MARTIN-MORENO, 1995;). Nesse contexto, devem ser considerados outros fatores de economia energética, tais como, o desequilíbrio na microbiota intestinal, além da adaptação dos mecanismos de consumo energético acarretando maior rendimento das calorias absorvidas (BALAMURUGAN et al., 2010; CANI; DELZENNE, 2009; DAVID et al., 2014; DEWULF et al., 2013; DIBAISE; FRANK; MATHUR, 2012; FRANKE, 2007; GRAF et al., 2015; KOENIGA et al., 2011; LE CHATELIER, et al., 2013; LEY et al., 2006; PATIL et al., 2012; RAOULT, 2008; SAWAYA et al., 2003; WICHMANN, et al., 2013).

Analisando a contribuição do consumo dos macronutrientes e das fibras, os resultados do presente estudo demonstraram que este consumo está dentro dos critérios, exceto para o consumo de fibras que foi abaixo da recomendação em ambos os grupos. Além disso, comparando-se as médias de consumo dos macronutrientes e das fibras, com as variáveis desfecho (obesas x eutróficas) também não houve associações estatisticamente significantes. Em São Paulo observou-se que 29,5% dos indivíduos entrevistados relataram ingestão inferior às necessidades fisiológicas, dos quais 58% eram indivíduos obesos (SALVO; GIMENO, 2002). Em outro estudo realizado com trabalhadores adultos de ambos os sexos, também no Estado de São Paulo para avaliação da ingestão alimentar e consumo de fibras dietéticas, foi encontrado que o consumo individual de fibras dietéticas diária variou 5,87 g a 29,57 g, sendo o consumo médio da população 14,61 g. (PASSOS; SHEID, 2008). Fisberg et al (2009), em estudo realizado sobre índice de qualidade da dieta, observaram padrão dietético com alto conteúdo de gorduras totais, colesterol e açúcar refinado e com baixo teor de fibra alimentar. Estes resultados diferem em parte do padrão alimentar da população estudada, no entanto, demonstra a necessidade de estímulo ao maior consumo de alimentos ricos em fibra.

A partir dos resultados do estudo, evidencia-se a adequação comprometida na alimentação devido à elevada ingestão de lipídios (gordura saturada) e ingestão reduzida de fibras, em ambos os grupos estudados, contribuindo tanto para a obesidade, quanto em relação ao acúmulo de tecido adiposo nas mulheres obesas e eutróficas. Esses dados estão em conformidade com o presente estudo em relação às variáveis antropométricas analisadas: Percentual de gordura corporal e Razão cintura-quadril, onde ambos os grupos se apresentaram acima da média referência, indicando excesso de gordura corporal. Assim como no presente estudo, outros trabalhos têm demonstrado limitações e evidenciado que não existe correlação precisa entre o IMC e o percentual de gordura corpórea. Isso explica o fato de indivíduos que apresentam IMC dentro do padrão de normalidade, mas possuem uma quantidade de gordura corporal acima do ideal, confirmando relatos de que o IMC não é um bom indicador quantitativo de adiposidade corporal e que pode subestimar o percentual de gordura e classificando de forma errônea indivíduos com excesso de adiposidade (COSTA et al., 2007; GLANER, 2005). Dessa forma, o aumento de gordura corporal, principalmente na região abdominal pode tornar a utilização do IMC cada vez mais limitada na avaliação do estado nutricional, já que indivíduos com sobrepeso ou até mesmo eutróficos podem apresentar risco de alterações metabólicas devido a valores elevados de circunferência da cintura (REZENDE, 2010). Além disso, nossos resultados evidenciaram valores elevados para RCQ, o que pode explicar a porcentagem de algumas moléstias atuais associadas à obesidade encontradas em ambos os grupos no presente trabalho (OMS, 2002; DÂMASO; BERNARDES, 2003; OCHS-BALCOM et al., 2006).

Diversos estudos também contribuíram na melhor compreensão entre as influências da nutrição e da composição corporal, na composição da microbiota intestinal. (BALAMURUGAN et al., 2010; DAVID et al., 2014; DEWULF et al., 2013; GRAF et al., 2015; WICHMANN, et al., 2013). No entanto, pouco se conhece sobre a participação dos micro-organismos da classe *Mollicutes* na microbiota, principalmente quando associadas com fatores dietéticos e antropométricos. Constatou-se no presente estudo diferença estatisticamente significativa para micro-organismos da classe dos *Mollicutes* ( $p = 0,0023$ ). Foi detectada associação estatisticamente significativa entre a presença de *Mollicutes* e mulheres obesas (O.R.= 11,5; I.C.= 2,42-55,4). Nesse contexto, Turnbaugh et al. (2008), avaliaram a

microbiota de modelos experimentais de ratos geneticamente idênticos, de obesidade induzida pelo consumo de dieta ocidentalizada caracterizada por alto teor de gordura e açúcar. Todos os animais herdaram uma microbiota semelhante, e no estado de obesidade, observou-se maior crescimento da bactéria *Eubacterium dolichum* (membro da classe *Mollicutes*) que foram posteriormente reduzidos por subsequentes manipulações dietéticas para limitar o ganho de peso. Ainda neste estudo observou-se que a abundância da classe dos *Mollicutes* foi acompanhada pela supressão de toda a divisão de *Bacteroidetes*, indicando que a classe *Mollicutes* teve aptidão aumentada em relação a *Firmicutes* e todos os outros *Bacteroidetes* identificados na população estudada. Os autores observaram que os mollicutes evoluíram a capacidade para importar o tipo de hidratos de carbono encontradas na dieta ocidental administrada nos modelos experimentais, estando essas vantagens principalmente relacionadas com o Sistema fosfotransferase (PTS). De acordo com Deutscher et al. (2006) o PTS desempenha um papel na regulação da expressão do gene microbiano através da repressão catabólica, permitindo que a célula passe a utilizar preferencialmente açúcares simples em relação a outros hidratos de carbono. Análises de fragmentos do gene 16S rRNA dos dados de metagenômica confirmaram a presença dos mollicutes no microbioma cecal, quando associados à uma dieta ocidental. Em contrapartida, Hildebrandt et al. (2009) por meio de metagenômica de fezes de camundongos magros inicialmente submetidos a dieta de ração padrão, com posterior mudança para dieta rica em gordura, não relataram encontrar mollicutes em dieta de alto teor de gordura.

No presente estudo, ao se comparar as médias de consumo dos macronutrientes carboidratos, proteínas, lipídios e fibras com as variáveis *Mollicutes* (presença x ausência), não foram observadas associações estatisticamente significantes. No entanto, foi observado alto consumo de gorduras saturadas nas mulheres estudadas, com diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de mollicutes na microbiota intestinal. Esses resultados, associados com as evidências encontradas na literatura acerca da participação desses microorganismos na microbiota de pessoas obesas, fornecem importantes evidências de que não apenas o consumo alimentar e o percentual de gordura ingerida possam influenciar o aumento de mollicutes na microbiota intestinal. Mas que esse aumento, também pode estar associado ao possível enriquecimento de rotas metabólicas

envolvidas na utilização de açúcares simples, relacionadas ao sistema PTS. Além disso, tem sido evidenciado na literatura que em experimentos com animais *germ-free*, o consumo de uma dieta obesogênica parece não estimular o desenvolvimento da obesidade e que sucessivas manipulações dietéticas para limitar o ganho de peso possivelmente promovam subseqüentes variações em relação à população microbiana na microbiota intestinal (GOODMAN et al., 2011; TURNBAUGH et al., 2009; WALKER et al., 2011; YI; LI, 2012). Este achado foi sustentado por um estudo recente em camundongos que mostrou que a composição microbiana do intestino não é determinada apenas pela dieta atual, mas também, em parte, pela história dietética. Além disso, um estudo em seres humanos concluiu que a mudança no padrão de consumo de fibras pode produzir fortes mudanças na microbiota intestinal, mas que estas dependem da composição inicial da microbiota intestinal do indivíduo (AAFKE et al., 2015; CARMODY et al., 2015).

Estudos recentes têm demonstrado que a microbiota intestinal humana pode estar alterada em indivíduos obesos. Nesse contexto, tem sido amplamente discutida a participação dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota desses indivíduos. Além disso, tem sido evidenciado que o filo *Firmicutes* representam mais de 90% das categorias filogenéticas conhecidas, dominando a microbiota distal. Nesse sentido, a obesidade está associada com as diferenças da microbiota intestinal em nível filo, com menor diversidade geral e maior proporção relativa de *Firmicutes* em relação à *Bacteroidetes* em indivíduos obesos em comparação com indivíduos eutróficos (ECKBURG et al., 2005; LEY et al., 2006; MORAN; SHANAHAN, 2014; TURNBAUGH et al., 2009). Nesse contexto, os resultados do presente estudo, demonstraram que a relação entre o percentual de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal das mulheres do grupo caso foi cerca de  $2,9 \times 10^7$  % maior entre as mulheres obesas em comparação com o grupo controle. Estudos demonstraram que a relação entre percentual de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal é de cerca de 70/20 para os não obesos e até 85/5 para os obesos. O que significa cerca de cinco vezes maior em obesos em comparação com não obesos (BALAMURUGAN et al., 2010; ECKBURG et al., 2005; KOENIGA et al., 2011; LE CHATELIER, et al., 2013; PATIL et al., 2012). Os nossos achados estão em conformidade com alguns resultados da literatura. Em estudo realizado por Ridaura et al. (2013), transplantaram-se micro-organismos intestinais de humanos

obesos e eutróficos em intestinos de ratos com peso médio. Aqueles que receberam a microbiota de humanos obesos tornaram-se ratos obesos, e aqueles que receberam microbiota de humanos magros permaneceram magros. Outro estudo realizado por Remely et al. (2015) que também investigaram através de qPCR a microbiota de humanos obesos durante a intervenção dietética para perda de peso induzida, observaram diminuição na proporção de *Firmicutes*/*Bacteroidetes* nos obesos após a intervenção dietética.

A proporção *Firmicutes*/*Bacteroidetes* tem sido associada como um marcador de saúde para um indivíduo, e um desequilíbrio nesta proporção está associada com diferentes doenças (MARIAT et al., 2009). A mudança na abundância relativa destes filos resulta no aumento da capacidade de captação de energia a partir dos alimentos, além de induzir a inflamação de baixo grau. A redução de *Bacteroidetes* tem sido relacionada com dieta rica em gordura, que pode resultar em aumento dos níveis plasmáticos de LPS (CANI et al, 2007; EVERARD; CANI, 2013), enquanto o aumento *Firmicutes* tem sido associado com o consumo de carnes (EVERARD; CANI, 2013). Além disso, vários estudos têm mostrado mudança da relação de *Firmicutes*/*Bacteroidetes* em pessoas obesas durante intervenções dietéticas para perda de peso corporal, sugerindo que as mudanças na concentração de bactérias nos indivíduos obesos podem ser revertidas depois da perda de peso induzida por dieta, fazendo com que a microbiota do indivíduo obeso se assemelhe ao indivíduo eutrófico (CLEMENTE et al, 2012; DEWULF et al., 2013; DIBAISE et al., 2012; REMELY et al., 2013, 2015). Em contrapartida, estes resultados não são universais, outros estudos demonstraram padrões variáveis em mudanças de nível de filo medidos na composição da microbiota de indivíduos obesos (MORAN; SHANAHAN, 2014; SCHWIERTZ et al., 2010; ZHANG et al., 2009). Duncan et al (2008), avaliaram a relação entre IMC, perda de peso e a predominância de grupos de bactérias em amostras fecais de pessoas obesas e não obesas. Estes indivíduos foram submetidos a duas dietas para perda de peso, por quatro semanas. Não foi encontrada diferença entre *Bacteroidetes* nas amostras entre indivíduos obesos e não obesos. No entanto, houve reduções no grupo de *Firmicutes* em obesos submetidos a dietas hipocalóricas. Em outro estudo realizado por Schwieritz et al. (2010), também não foram observadas diferenças nas contagens de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* entre os grupos de estudo. Xiao et al. (2014) em estudo com intervenção

dietética baseada em grãos integrais, onde analisaram a microbiota intestinal de 123 voluntários obesos, antes e depois da intervenção de 9 semanas, seguida por um período de manutenção de 14 semanas, também não observaram alterações significativas na abundância de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* ou na proporção destes dois filos durante a intervenção dietética mesmo quando os voluntários perderam uma quantidade significativa de peso. Estudos recentes do Projeto Microbioma Humano, não encontraram associação entre a proporção *Firmicutes/Bacteroidetes* e obesidade ou Índice de Massa Corporal (IMC). Nesse sentido, tem sido sugerido por alguns autores que a utilização dessa relação como um biomarcador para a obesidade permanece incerto, devido a variabilidade dos dados na literatura (FINUCANE et al., 2014; MURPHY et al., 2010).

Recentemente, tem sido proposta uma nova hipótese que associa a microbiota intestinal com a homeostase metabólica demonstrando-a como uma das fontes potenciais de inflamação de baixo grau (ARAKI et al., 2005; OKAYASU et al., 1990; RAKOFF-NAHOUM, 2004; XIAO et al., 2014; ZHAO, 2013). Nesse contexto, tem sido demonstrado que dietas com alto teor de gordura também podem aumentar as concentrações de LPS no plasma de humanos. Estudo realizado por Cani et al (2007) mostrou em camundongos que o maior consumo de gordura levou ao maior aumento nas concentrações de LPS no plasma. A absorção de LPS, reforçada pela alta ingestão de gordura, pode estimular a secreção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, resultando em inflamação sistêmica de baixo grau, dessa forma a microbiota intestinal pode ter papel ativo na promoção e/ou inibição da inflamação e, portanto, um efeito no metabolismo lipídico (FLOCK; GREEN; KRIS-ETHERTON, 2011). Os resultados do presente estudo não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos caso e controle para nenhuma das citocinas avaliadas. No entanto, estudos *in vitro* mostraram que o consumo de ácidos graxos saturados, também observado no presente estudo em ambos os grupos, promovem processo inflamatório, com aumento da expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ , de TLR- 4 e consequente aumento da ativação da via NF- $\kappa$ B (AJUWON; SPURLOCK, 2005; CALDER et al., 2011; WEATHERILL et al., 2005). Em estudos experimentais, a dieta hiperlipídica rica em gordura saturada demonstrou promover obesidade, com consequente aumento de peso corporal, adiposidade e marcadores inflamatórios (FERNANDEZ-REAL et al., 2003; PEREIRA et al., 2012). Esses achados podem explicar o fato de

que no presente estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação a liberação de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , entre os grupos estudados. Em relação à liberação da citocina IL-17, também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, no entanto, os achados da literatura, têm sugerido que no contexto de disbiose a presença de agentes patogênicos pode perturbar a regulação do ambiente anti-inflamatório, e que quando patógenos entéricos superam as bactérias comensais, o desequilíbrio entre comensais e bactérias patogênicas provocam liberação significativa de MAMPs. Este aumento pode induzir IECs, DCs e macrófagos ativados, a secretar citocinas inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, e IL-23. Estas citocinas estimulam o desenvolvimento de células CD4+, T auxiliares (T helper-TH1) e células TH17 (produzem IL-17A, IL-17F, e IL-22), resultando na inflamação crônica (MAYNARD et al., 2012).

O estudo da influência de diferentes elementos da dieta e composição corporal sobre a variação da composição da microbiota tornou-se uma área de crescente interesse científico. Com efeito, a relação entre a microbiota intestinal e a obesidade está bastante reconhecida. No entanto, a participação dos microorganismos da classe dos *Mollicutes* e alguns mecanismos subjacentes a essas interações permanecem pouco estudados. Em relação às limitações do estudo, deve-se considerar o desenho transversal, não sendo possível estabelecer relação de causa e efeito. No entanto, o estudo mostra-se relevante, destacando como ponto forte o cuidado metodológico e a relevância dos resultados encontrados contribuindo para o avanço dos estudos da relação entre os mollicutes, microbiota intestinal e obesidade. Nesse contexto, a importância e validade de estudos como este é apontar os possíveis fatores de risco que contribuam para obesidade, sendo que a cuidadosa interpretação dos resultados é importante para a geração de hipóteses.

Nesse contexto, uma pesquisa acerca da relação causa-efeito entre a microbiota intestinal e a obesidade é altamente justificável, uma vez que diferentes espécies de bactérias podem desempenhar um papel significativo na safra de energia humana e regulação do peso corporal. Além disso, a consideração de fatores de estilo de vida em estudos da microbiota intestinal é altamente recomendada, uma vez que mudanças no padrão alimentar e atividade física podem influenciar a composição da microbiota intestinal para o desenvolvimento da

obesidade. A partir disso, o presente estudo, fornece evidências de que alterações e interações na microbiota intestinal possam definir subconjuntos de indivíduos, com diferentes perfis de risco metabólico e, assim, contribuir para a investigação da heterogeneidade associada a fenótipos relacionados com a adiposidade, especialmente em sociedades que estão passando por transformações socioeconômicas, tecnológicas e culturais, para um estilo de vida moderno.

## 7 CONCLUSÕES

- Os grupos caso e controle balancearam suas dietas conforme o intervalo de distribuição energética recomendado, no entanto, foi observado um consumo de fibras inferior, e de gorduras saturadas superior ao recomendado em ambos os grupos;
- As mulheres de ambos os grupos apresentaram excesso de gordura corporal;
- Foi desenvolvido um ensaio de PCR em tempo real específico, sensível, reprodutível e quantitativo para a detecção de *Mollicutes* nas fezes humanas;
- Foram encontradas associações estatisticamente significantes entre a presença de *Mollicutes* e mulheres obesas;
- Não foram observadas associações estatisticamente significantes em relação as médias de consumo dos macronutrientes carboidratos, proteínas, lipídios e fibras com a presença de *Mollicutes*;
- Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para as cargas de *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e Bactérias totais entre as mulheres do grupo caso e controle;
- A proporção de *Firmicutes* em relação aos *Bacteroidetes* foi maior na microbiota intestinal das mulheres obesas em relação às eutróficas;
- Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle para nenhuma das citocinas avaliadas.

## REFERÊNCIAS\*

AAGAARD, K.; RIEHLE, R.; MA, J.; SEGATA, N.; MISTRETTA, T.; COARFA, C.; RAZA, S.; ROSENBAUM, S.; VAN DEN VEYVER, I.; MILOSAVLJEVIC, A.; GEVERS, D.; HUTTENHOWER, C.; PETROSINO, J.; VERSALOVIC, J. A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy. **Plos one**, v.7, n.6, p.364-366, 2012.

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

ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E. Establishment of the gut microbiota in Western infants. **Acta. Paediatr.**, v.98, p.229-238, 2009.

AJUWON, K. M.; SPURLOCK, M. E. Palmitate activates the nf-kappab transcription factor and induces il-6 and tnf alpha expression in 3t3-l1 adipocytes. **J. Nutr.**, v.135, n.69, p.1841-1846, 2005.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal: revisão. **Rev. Bras. Nutr. clín.**, v.24, n.1, p.58-65, 2009.

AMUNA, P.; ZOTOR F. B.; Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impacto n human health and development. **Proc. Nutr. Soc.**, v.67, n.1, p.82-89, 2008.

ARAI, J. A.; LI, S.; HARTLEY, D. M.; FEIG, L. A. Transgenerational rescue of a genetic defect in long-term potentiation and memory formation by juvenile enrichment. **J. Neurosci.**, v. 29, p. 1946-1503, 2009.

ARAKI, A.; KANAI, T.; ISHIKURA, T.; MAKITA, S.; URAUSHIHARA, K.; IYAMA, R.; TOTSUKA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; WATANABE, M. Myd88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. **J. Gastroenterol.**, v.40, n.32, p.16-23, 2005.

ARORA, T.; SHARMA, R. Fermentation potential of the gut microbiome: implications for energy homeostasis and weight management. **Nutri. Rev.**, v.69, n. 2, p. 99-106, 2011.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v.473, n.7346, p.174-80, 2011.

AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A. M. et al. Probiotics and health: an evidence-based review. **Pharmacol. Res.**, v.63, p.366–76, 2011.

AZAD, B. M.; KONYA, T.; MAUGHAN, H.; GUTTMAN, D. S.; FIELD, C. J.; CHARI, R. S.; SEARS, M. R.; BECKER, A. B.; SCOTT, J. A.; KOZYRSKYJ, A. L.; CHILD Study Investigators. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. **CMAJ**, v. 185, n. 5, p. 385-94. 2013.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.101, n. 44, p.1571-1578, 2004.

BACKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v.307, n. 5717, p.1915–1920, 2005.

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

BACKHED, F.; MANCHESTER, J. K.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.104, n.3, p.979–984, 2007.

BACON, L.; APHRAMOR, L. Weight Science: Evaluating the Evidence for a Paradigm Shift. **Nutr. J.**, v. 10, n. 9, p. 1186 -1190, 2011.

BAHIA, L.; COUTINHO, E. S. F.; BARUFALDI, L. A.; ABREU, G. A.; MALHÃO, T. A.; SOUZA C. P. R.; ARAUJO, D. V. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 18, n.12, p.440, 2012.

BAJZER, M.; SEELEY, R. J. Obesity and gut flora. **Nature**, v. 444, n.6, p. 1009-1010, 2006.

BALABANOV, D. N.; RAKOVSKAIA, I. V.; GORINA, L. G.; GONCHAROVA, S. A.; GAMOVA, N. A.; BARKHATOVA, O. I. The comparison of mycoplasma detection methods in the urogenital tract infection. **Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.**, v. 4, n.2, p. 82-85, 2006.

BARROS, M. V. G.; NAHAS, M. V. Reprodutibilidade (teste- reteste) do Questionário Internacional de Atividades Físicas (QIAF-Versão 6): um estudo-piloto com adultos no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Mov.**, v.8, n.1, p.23-6, 2000.

BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: sophisticated reemerging and burdened by their notoriety. **Emerg. Infect. Dis.**, v.3, n.1, p.21-32, 1997.

BELLAHCENE, M.; O'DOWD, J. F.; WARGENT, E. T.; ZAIBI, M. S.; HISLOP, D. C.; NGALA, R. A.; SMITH D. M.; CAWTHORNE, M. A.; STOCKER, C. J.; ARCH, J. R. Male mice that lack the G-protein-coupled receptor GPR41 have low energy expenditure and increased body fat content. **Br. J. Nutr.**, v. 109, n.10, p.1755–1764, 2013.

BERG, A. H; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ. Res.**, v.96, n.34, p. 939-949, 2005.

BERGEY'S. Manual of determinative bacteriology. Michigan: Michigan State University, 2001. Disponível em: <<http://www.cme.msu.edu/bergeys>>. Acesso em: 14 Mar. 2015.

BERGEY'S. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: \_\_\_\_\_ **Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag. 2010. v.4, p.721.

BERGEY'S. *The Firmicutes*. In: \_\_\_\_\_ **Manual of Systematic Bacteriology** 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2009. v.3, p.531.

BEYER, P. L. Digestão, absorção, transporte e excreção de nutrientes. In: MAHAN LK, ESCOTT-STUMPS, (eds). **Krause – alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10. ed. São Paulo:Roca, 2002. p. 3-17.

BIASUCCI, G.; BENENATI, B.; MORELLI, L.; BESSI, E.; BOEHM, G. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. **J. Nutr.**, v.138, n.9; p. 1796-1800, 2008.

BINDELS, L. B.; DEWULF, E. M.; DELZENNE, N. M. GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.34, n.4, p. 226–232, 2013.

BLUMBERG, R. S.; SAUBERMANN, L. J.; STROBER, W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Immunol.**, v.11, n. 31, p.648-656, 1999.

BOUCHARD, C. Introduction. In: **PHYSICAL Activity and Obesity**. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers, 2000. p.17.

BOVÉ, J. M. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumonia microbe, by Nocard and Roux, with the collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. **Res. Microbiol.**, v. 150, n.67, p. 239-245, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. **Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa.** – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. Microbial translocation across the GI tract. **Annu. Rev. Immunol.**, v.30, n.5, p.149–173, 2012.

BROWN, D. R.; WHITCOMB, R. F.; BRADBURY, J. M. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, n.11, p. 2703-2719, 2007.

BRY, L.; FALK, P. G.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I; A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. **Science**, v.273, n.5280, p.1380-1383, 1996.

BYGREN, L. O.; TINGHÖG, P.; CARSTENSEN, J.; EDVINSSON, S.; KAATI, G.; PEMBREY, M.E. et al. Change in paternal grandmothers' early food supply influenced cardiovascular mortality of the female grandchildren. **BMC Genet.**, v. 20, n.12, p.15-12, 2014.

CAESAR, R.; REIGSTAD, C. S.; BACKHED, H. K.; REINHARDT, C.; KETONEN, M.; LUNDEN, G. O.; CANI, P. D.; BACKHED, F. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. **Gut**, v.61, n.50, p.1701–1707, 2012.

CALDER, P. C.; AHLUWALIA, N.; BROUNS, F.; BUETLER, T.; CLEMENT, K.; CUNNINGHAM, K.; ESPOSITO, K.; JONSSON, L. S.; KOLB, H.; LANSINK, M.; MARCOS, A.; MARGIORIS, A.; MATUSHESKI, N.; NORDMANN, H.; O'BRIEN, J.; PUGLIESE, G.; RIZKALLA, S.; SCHALKWIJK, C.; TUOMILEHTO, J.; WARNBERG, J.; WATZL, B.; WINKLHOFFER-ROOB, B.M. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **Br. J. Nutr.**, v.106, n. 68, p.65-78, 2011.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Curr. Pharm. Des.**, v.15, n.13, p.1546-1558, 2009.

CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M.; KNAUF, C.; BASTELICA, D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; CHABO, C.; WAGET, A.; DELMEE, E.; COUSIN, B.; SULPICE, T.; CHAMONTIN, B.; FERRIERES, J.; TANTI, J. F.; GIBSON, G. R.; CASTEILLA, L.; DELZENNE, N. M.; ALESSI, M. C.; BURCELIN, R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v.56, n.7, p.1761-1772, 2007.

CANI, P. D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A.; NEYRINCK, A. M.; DELZENNE, N. M.; BURCELIN, R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v.57, n.6, p. 1470–1481, 2008.

CARDWELL, C. R.; STENE, L. C.; JONER, G.; CINEK, O.; SVENSSON, J.; GOLDACRE, M. J.; PARSLAW, R. C.; POZZILLI, P.; BRIGIS, G.; STOYANOV, D.; URBONAITE, B.; SIPETIĆ, S.; SCHOBER, E.; IONESCU-TIRGOVISTE, C.; DEVOTI, G.; DE BEAUFORT, C. E., BUSCHARD, K.; PATTERSON, C. C. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. **Diabetologia**, v.51, n.5, p.726-35, 2008.

CARMODY, R. N.; GERBER, G. K.; LUEVANO, J. M. J.; GATTI, D. M.; SOMES, L.; SVENSON, K. L.; TURNBAUGH, P. J. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. **Cell Host Microbe**, v.17, n.1, p. 72–84, 2015.

CERVANTO, A. M.; MAZZILI, R. N.; MARTINS, I. S.; MARUCCI, M. F. N. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Rev. Saúde Pública**, v.31, n.3. p.227-235, 1997.

CLEMENTE, J. C.; URSELL, L. K.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v.148, n.6, p.1258-1270, 2012.

CLUNY, N. L.; ELLER, L. K.; KEENAN, C. M.; REIMER, R. A.; KEITH A. SHARKEY, K. A.; Interactive Effects of Oligofructose and Obesity Predisposition on Gut Hormones and Microbiota in Diet-Induced Obese Rats. **Obesity**, v.23, n.4, p. 769-778, 2015.

COELHO, N. L. P. **Associação entre padrões de consumo alimentar gestacional e peso ao nascer**. 2011.105f. [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, 2011.

CUMMINS, A. G.; THOMPSON, F. M. Postnatal changes in mucosal immune response: a physiological perspective of breast feeding and weaning. **Immunol. Cell. Biol.**, v.75, n.5, p.419-429, 1997.

DAILEY, M. J. Nutrient-induced intestinal adaptation and its effect in obesity. **Physiology Behavior**, v.136, p.74–78, 2014.

DAVID, L. A.; MAURICE, C. F.; CARMODY, R. N.; GOOTENBERG, D. B.; BUTTON, J. E.; WOLFE, B. E.; LING, A. V.; DEVLIN, A. S.; VARMA, Y.; FISCHBACH, M. A.; BIDDINGER, S. B.; DUTTON, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v.505, p.559-563, 2014.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v.107, n.33, p.14691-14696, 2010.

DE LA SERRE, C. B.; ELLIS, C. L.; LEE, J.; HARTMAN, A. L.; RUTLEDGE, J. C.; RAYBOULD, H. E. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.299, p.440–448, 2010.

DE SANTA BARBARA, P.; VAN DEN BRINK, G. R.; ROBERTS, D. J. Development and differentiation of the intestinal epithelium. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.60, p. 1322-1332, 2003.

DERAM, S.; VILLARES, S. M. F. Genetic variants influencing effectiveness of weight loss strategies. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n.2, p. 129-138, 2009.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, v.449, n. 7164, p.811-818, 2007.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M. L.; RELMAN, D. A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biol.**, v.18, n.6, p.11-28, 2008.

DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C.; POSTMA, P. W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.70, p. 939–1031, 2006.

DEWULF, E. M.; CANI, P. D.; CLAUS, S. P.; FUENTES, S.; PUYLAERT, P. G. B.; NEYRINCK, A. M.; BINDELS, L. B.; DE VOS, W. M.; GIBSON, G. R.; THISSEN, J. P.; DELZENNE, N. M. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. **Gut**, v.62, p.1112-1121, 2013.

DIBASE, J. K.; FRANK, D. N.; MATHUR, R. Impact of the Gut Microbiota on the Development of Obesity: Current Concepts. **Am. J. Gastroenterol. Suppl.**, v.1, p.22-27; 2012.

DIELEMAN, L. A.; PALMEN, M. J.; AKOL, H.; BLOEMENA, E.; PENA, A. S.; MEUWISSEN, S.G.; VAN REES, E. P. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (dss) is characterized by th1 and th2 cytokines. **Clin. Exp. Immunol.**, v.114, p. 385-391, 1998.

DING, S.; CHI, M. M.; SCULL, B. P.; RIGBY, R.; SCHWERBROCK, N. M.; MAGNESS, S.; JOBIN, C.; LUND, P. K. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. **Plos one**. v.5, p. 121-191, 2010.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; COSTELLO, E. K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.107, n.11971-11975, 2010.

DONOVAN, S.M. Role of human milk components in gastrointestinal development: Current knowledge and future needs. **J. Pediatr.**, v.149, p.49-61, 2006.

DONOVAN, S.M.; ODLE, J. Growth factors in milk as mediators of infant development. **Annu. Ver. Nutr.**, v.14, p.147-167, 1994.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I.; POLANCZYK, C. A.; HOMRICH, C. S.; ROSA, R. S.; ACHUTTI, A. C. Fatores de risco para doenças não-transmissíveis em áreas metropolitanas na região sul do Brasil: prevalência e simultaneidade. **Rev. Saúde Pública**, v.27, p.143-148, 1993.

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

DYBVIG, K. Mycoplasmal genetics. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 81-104, 1990.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v.308, n.5728, p. 1635-1638, 2005.

ERICKSON, B. Z.; ROSS, R. F.; BOVE, J. M. Isolation of Mycoplasma salivarium from swine. **Vet. Microbiol.**, v. 16, n. 4, p. 385-390, 1988.

EVANS, C. C.; LEPARD, K. J.; KWAK, J. W.; STANCIUKAS, M. C.; LASKOWSKI, S.; DOUGHERTY, J.; MOULTON, L.; GLAWE, A.; WANG, Y.; LEONE, V.; ANTONOPOULOS, D. A.; SMITH, D.; CHANG, E. B.; CIANCIO, M. J. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. **PLoS One**, v.9, p.921-993, 2014.

EVERARD, A.; BELZER, C.; GEURTS, L.; OUWERKERK, J. P.; DRUART, C.; BINDELS, L. B.; GUIOT, Y.; DERRIEN, M.; MUCCIOLI, G. G.; DELZENNE, N. M.; YOS, W. M.; CANI, P. D. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.110, n.22, p.9066-9071, 2013.

EVERARD, A.; CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.27, n.1, p.73-83, 2013.

EVERARD, A.; GEURTS, L.; CAESAR, R.; VAN HUL, M.; MATAMOROS, S.; DUPARC, T.; DENIS, R. G.; COCHEZ, P.; PIERARD, F.; CASTEL, J.; BINDELS, L. B.; PLOVIER, H.; ROBINE, S.; MUCCIOLI, G. G.; RENAULD, J. C.; DUMOUTIER, L.; DELZENNE, N. M.; LUQUET, S.; BACKHED, F.; CANI, P. D. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. **Nat. Commun.**, v.5, n. 5648, 2014.

EVERARD, A.; LAZAREVIC, V.; DERRIEN, M.; GIRARD, M.; MUCCIOLI, G.G.; NEYRINCK, A. M.; POSSEMIERS, S.; VAN HOLLE, A.; FRANCOIS, P.; DE VOS W. M.; DELZENNE, N. M.; SCHRENZEL, J.; CANI, P. D. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. **Diabetes**, v.60, p.2775–2786, 2011.

FAGARASAN, S.; KAWAMOTO, S.; KANAGAWA, O.; SUZUKI, K.. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and Tcell-independent IgA synthesis. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n.1, p.243–273, 2010.

FARIAS, F. A. B. **Prevalência de osteoporose, fraturas vertebrais, ingestão de cálcio e deficiência de vitamina D em mulheres na pós- menopausa.** 2003, 164f. (Tese de Doutorado). FioCruz. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, 2003.

FERNANDEZ-REAL, J. M.; BROCH, M.; VENDRELL, J.; RICART, W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. **Diabetes Care**, v.26, p.1362-1368, 2003.

FERREIRA, V. A. Magalhães R. Obesidade entre os pobres: a vulnerabilidade feminina. **Ciência e Saúde**, v.16, n.4, p.2279-2289, 2011.

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

FIERER, N.; JACKSON, J. A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R. B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, p. 4117–4120, 2005.

FINUCANE, M. M.; SHARPTON, T. J.; LAURENT, T. J.; POLLARD, K.S. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. **PLoS One**, v.9, n.1, p. 846-889, 2014.

FISBERG, R. M.; COLUCCI, A. C. A.; MORIMOTO, J. M.; MARCHIONI, D. M. L. Questionário de frequência alimentar para adultos com base em estudo populacional. **Rev. Saúde Pública**, v. 42, p. 550-554, 2008.

FLEISSNER, C. K.; HUEBEL, N.; ABD EL-BARY, M. M.; LOH, G.; KLAUS, S.; BLAUT, M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. **Br. J. Nutr.**, v.104, n.6, p. 919-929, 2010.

FLINT, H. J.; SCOTT, K. P.; LOUIS, P.; DUNCAN, S. H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v.9, p.577–89, 2012.

FRANCHI, L.; WARNER, N.; VIANI, K.; NUÑEZ, G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol. Rev.**, v.227, n.1, p.106-28, 2009.

FRANCISCHI, R. P. P. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição Campinas**, v.13, n.1, p. 17-28, 2000.

FRANCOIS-PIERRE J. M.; SPRENGER, N.; YAP, I. K. S.; WANG, Y.; BIBILONI, R.; ROCHAT, F.; REZZI, S.; CHERBUT, C.; KOCHHAR, S.; LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Panorganismal Gut Microbiome-Host Metabolic Crosstalk. **Journal of Proteome Research**, v.8, p.2090–2105, 2009.

FRANK, D. N.; ST AMAND, A. L.; FELDMAN, R. A.; BOEDEKER, E. C.; HARPAZ, N.; PACE, N. R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.104, n.34, p.13780–13785, 2007.

FRANKE, D.; FRANCISCA, M. A. W.; DANIEL, P. R. Á. Estilo de vida e fatores de risco para o sobrepeso e obesidade em mulheres de baixa renda. **Cinergis**, v.8, n.1, p.40-49, 2007.

GABRIDGE, M. G.; CHANDLER, D. K. F.; DANIELS, M. J. Pathogenicity factors in Mycoplasmas and Spiroplasmas. In: RAZIN, S.; BARILE, M. F. **The mycoplasmas IV: mycoplasma pathogenicity**. Londres Academic Press, 1985. p. 313-351.

GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v.7, p.503–514, 2010.

GIACOMELLO, A.; SCHMIDT, M. I.; NUNES, M. A. A.; DUNCAN, B. B.; SOARES, R. M.; MANZOLL, I. P.; CAMEY, S. Validação relativa de Questionário de Frequência Alimentar em gestantes usuárias de serviços 35 do Sistema Único de Saúde em dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Bras. Saude Mater.**, v.8, n.4, p. 445-454, 2008.

GIGANTE, D. P., BARROS, F. C., POST, C. L. A., OLINTO, M. T. A. Prevalência de obesidade em adultos e seus fatores de risco. **Rev. Saúde Públ.**, v.31, n.3, p.236-46, 1997.

GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. **Science**, v.312, n.5778, p.1355-1359, 2006.

GOODRICK, G. K.; POSTON, W. S.; FOREYT, J. P. Methods for voluntary weight loss and control: update 1996. **Nutrition**, v. 12, n. 10, p. 672-676, 1996.

GORAN, M. I. Energy metabolism and Obesity. **Méd. Clin. North Am.**, v.84, n.2, p.347-362, 2000.

GORDON, J. I.; HOOPER, L. V. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v.292, n.5519, p.1115-1118, 2001.

GOTO, Y.; IVANOV, I. I. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. **Immunology and Cell Biology**, v.91, n.3, p.204–214, 2013.

GOULET, M.; DULAR, R.; TULLY, J. G.; BILLOWES, G.; KASATIYA, S. Isolation of Mycoplasma pneumoniae from the human urogenital tract. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 2823-5, 1995.

GRAF, D.; CAGNO, R. D.; FAK, F.; FLINT, H. J.; NYMAN, M.; SAARELA, M.; WATZL, B. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v.26, p. 261-264, 2015.

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

GUILLOTEAU, P.; MARTIN, L.; EECKHAUT, V.; DUCATELLE, R.; ZABIELSKI, R.; VAN IMMERSEEL, F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. **Nutr. Res. Rev.**, v.23, p.366–384, 2010.

- GUO, X.; XIA, X.; TANG, R.; ZHOU, J.; ZHAO, H.; WANG, K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.47, n.5, p.367-73, 2008.
- HAJELA, N.; RAMAKRISHNA, B. S.; NAIR, G. B.; ABRAHAM, P.; GOPALAN, S.; GANGULY, N. K. Gut microbiome, gut function, and probiotics: Implications for health. **Indian J. Gastroenterol.**, v.34, n.2, p.93-107, 2015.
- HAMER, H. M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F.J.; BRUMMER, R. J. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Aliment Pharmacol Ther.** v.15, n.2, p. 104-119, 2008.
- HANSON, M.; FALL, C.; ROBINSON, S. et al. Early life nutrition and lifelong health. BMA Board of Science, 2009. [Acesso em 2015] Disponível em [http://www.bma.org.uk/health\\_promotion\\_ethics/child\\_health/earlylifefnutrition.jsp](http://www.bma.org.uk/health_promotion_ethics/child_health/earlylifefnutrition.jsp).
- HARDIE, D. G.; SAKAMOTO, K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. **Physiology**, V.21, p.48-60, 2006.
- HARRIS, K.; KASSIS, A.; MAJOR, G.; CHOU, C. J. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? **J. Obes.**, v.2012, 2012.
- HATTORI, M.; TAYLOR, T. D. The human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. **Oxford Journals**, v.16; n.1; p.1-12, 2008.
- HAWRELAK, J. A.; MYERS, S. P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. **Altern. Med. Rev.**, v.9, n.2, p.180-97, 2004.
- HILDEBRANDT, M. A.; HOFFMANN, C.; SHERRILL-MIX, S. A.; KEILBAUGH, S. A.; HAMADY, M.; CHEN, Y. Y.; KNIGHT, R.; AHIMA, R. S.; BUSHMAN, F.; WU, G. D. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v.137, n.5, p.1716-24, 2009.
- HORNOK, S.; HAJTÓS, I.; MELI, M. L.; FARKAS, I.; GÖNCZI, E.; MEILI, T.; HOFMANN LEHMANN, R. First molecular identification of *Mycoplasma ovis* and 'candidate *M. haemoovis*' from goat, with lack of haemoplasma pcr-positivity in lice. **Acta. Veterinaria Hungarica.**, v. 3, n.60, p. 355–360, 2012.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. **Cell**, v.140, n.6, p900–917, 2010.
- HU, F.B. Obesity epidemiology. **Oxford University Press**; 2008.
- HU, F. B.; VAN DAM, R. M.; LIU, S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. **Diabetology**, v.44, p.805-817, 2001.
- HUTSON, E. M. N. L.; COHEN, N. D.; KUNKELL, R. C.; Measures of body fat and related factors in normal adults. **Journal American Diet Association**, v.47, p.176-86, 1965.
- HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R.; ABUBUCKER, S.; BADGER, J. H.; CHINWALLA, A.T.; et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v.486, n.7402, p.207-214, 2012.
- INOUE, D.; TSUJIMOTO, G.; KIMURA, I. Regulation of energy homeostasis by GPR41. **Front. Endocrinol.**, v.5, n.81, 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. 110 p.

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: IBGE, 2010. 155 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Despesas, Rendimento e Condições de Vida**. Rio de Janeiro, 2010. [acesso em 08 maio 2015]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009/POFpublicacao.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/POFpublicacao.pdf).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiar 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos do estado nutricional no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. 185 p.

ISO, T.; SUZUKI, J.; SASAOKA, F.; SASHIDA, H.; WATANABE, Y.; FUJIHARA, M.; NAGAI, K.; HARASAWA, R. Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). **Vet. Microbiol.**, v. 1-2, n.163, p. 184-189, 2013.

ISOMAA, B.; ALMGREN, P.; TUOMI, T.; FORSÉN, B.; LAHTI, K.; NISSÉN, M.; et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v.24, n.4, p.683-688, 2001.

JERNBERG, C.; LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J. K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, v.156, n.11, p.3216-3223, 2010.

JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R.; ODRIOZOLA, J. M.; NUENOPALOP, C.; NARBAD, A.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; RODRÍGUEZ, J. M. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Curr. Microbiol.**, v.51, n.4, p.270-274, 2005.

JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R.; ODRIOZOLA, J. M.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Res. Microbiol.**, v.159, n.3, p.187-193, 2008.

JIMENEZ, L. G.; MARTIN-MORENO, J. M. **Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario**. In: MAJEM, L.S.; BARTINA, J.Á.; MATAIX-VERDUJ. *Nutrición y Salud Pública* Barcelona: Masson, p. 120-125, 1995.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nat. Rev. Genet.**, v. 8, p. 253-262; 2007.

JOHANSSON, K. E.; PETTERSSON, B. Taxonomy of Mollicutes. In: **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. In: RAZIN, S.; R. HERRMANN, R. New York: **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, 2002, p.1–31.

JÚNIOR J. F. *Biblioteca de doenças – colite, retrocolite ulcerativa, doença de Crohn*. São Paulo: **Associação Brasileira de Medicina Complementar**, 2004.

KAC, G.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. **Cad. Saúde Pública**, v.19, sup.1, s.4-5, 2003.

KAMADA, N.; CHEN, G. Y.; INOHARA, N.; NUNEZ, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nat. Immunol.**, v.14, p.685–690, 2013.

KARAMI, N.; MARTNER, A.; ENNE, V. I.; SWERKERSSON, S.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E. Transfer of an ampicillin resistance gene between two *Escherichia coli* strains in the

bowel microbiota of an infant treated with antibiotics. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.60, n.5, p.1142-1145, 2007.

KIM, D. H.; JUNG, E. A.; SOHNG, I. S.; HAN, J. A.; KIM, T. H.; HAN, M. J. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. **Arch. Pharm. Res.**, v.21, p.17–23, 1998.

KINROSS, J. M.; DARZI, A. W.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiome-host interactions in health and disease. **Genome Medicine.**, v.3, n.14, 2011.

KLEEREBEZEM, M.; VAUGHAN, E. E. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 63, p.269-290, 2009.

KOENIG, J. E.; SPOR, A.; SCALFONE, N.; FRICKER, A. D.; STOMBAUGH, J.; KNIGHT, R.; ANGENENT, L.T.; LEY, R. E. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 108, p.4578–4585, 2011.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, J. W.; PAWLIK, T; BRZOZOWSKI, T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake, **J. Physiol. Pharmacol.**, v.55, p.137-154, 2004.

KORKEILA, M.; RISSANEN, A.; KAPRIO, J.; SORENSEN, T. I. A.; KOSKENVUO, M. Weight-loss attempts and risk of major weight gain: a prospective study in Finnish adults. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 965-975, 1999.

LAM, Y. Y.; HA, C. W.; CAMPBELL, C. R.; MITCHELL, A. J.; DINUDOM, A.; OSCARSSON, J.; COOK, D. I.; HUNT, N. H.; CATERSON, I. D.; HOLMES, A. J.; STORLIEN, L. H. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. **Plos one**, v.7, n.3, p.342-353 2012.

LANGA, S. **Interacciones entre Bacterias lácticas, células del epitelio intestinal y células del sistema inmunitario, Desarrollo de um modelo in vitro.** 2006. 125 f. (Tese de doutorado). Faculdade de Veterinária. Madri: Universidade Complutense de Madrid, 2006.

LESSA, I. Os programas nacionais de educação e controle para DCNT. In: LESSA, I. **Adulto brasileiro e as doenças da modernidade. Epidemiologia das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil.** Hucitec, São Paulo, p. 241-250, 1998.

LEVY-COSTA, R. B.; SCHIERE, R.; PONTES, N. S. D.; MONTEIRO, C. A. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Rev. Saúde Pública.**, v.39, n.4, p. 530-540, 2005.

LEY, R. E.; BÄCKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.102, p.11070–11075, 2005.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; SCHLEGEL, M. L.; TUCKER, T. A.; SCHRENZEL, M. D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Evolution of Mammals and their gut microbes. **Science**, v.320, n.5883, p.1647-1651, 2008.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v.444, n.7122, p. 1022–1023, 2006.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; TULLY, J. G.; WANG, R. Y. H.; KOTAN, H.; PIERCE, P. F.; ROSE, D. D. L.; SHIH, J. W. K. *Mycoplasma penetrans* sp. nov. from the Urogenital Tract of Patients with AIDS. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 3, p. 357-364, 1992.

LUDWIG, W.; KLENK, H. P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M.

(eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. . New York: Springer-Verlag, 2001. p. 49-65.

LYRA, A.; LAHTINEN, S.; TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C. Intestinal microbiota and overweight. **Benef. Microbes.**, v.1, n.4, p.407-21, 2010.

MACCARTHY, M. C. Dietary and activity patterns of obese women in Trinidad. **Journal American Dietetic Association.**, v.48, n.1, p.33-37, 1966.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R.; Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, p.1035–1045, 1999.

MACPHERSON, A. J.; GEUKING, M.B.; MCCOY, D. Homeland Security: IgA immunity at the frontiers of the body. **Trends in Immunology**, v. 33, n.4, p.160–166, 2012.

MANACH, C.; DONOVAN, J. L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radic Res.** v.38, p.771–785, 2004.

MANILOFF, J. Phylogeny and evolution. In **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**, p.31–45. In: RAZIN, S.; R. HERRMANN, R. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

MARANDUBA, C. M. C.; CASTRO, S. B. R.; SOUZA, G. T.; ROSSATO, C.; GUIA, F.C.; VALENTE, M. A. S.; RETTORE, J. V. P.; MARANDUBA, C. P.; SOUZA, C. M.; CARMO, A. M. R.; MACEDO, G. C.; SILVA, F. S. Intestinal Microbiota as Modulators of the Immune System and Neuroimmune System: Impact on the Host Health and Homeostasis. **Journal of Immunology**, v.2015, n.1, p. 12-22, 2015.

MARIAT, D.; FIRMESSE, O.; LEVENEZ, F.; GUIMARAES, V.; SOKOL, H.; DORE, J.; CORTIER, G.; FURET, J. P. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, n.123, 2009.

MARIE, N. G.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C.; MULLANY, E. C.; BIRYUKOV, S.; ABBAFATI, C.; ABERA, S. F.; ABRAHAM, J. P.; ABU9RMEILEH, N. M.; ACHOKI, T. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v.384, n.9945, p.766-781, 2014.

MARQUES, A. P. O.; ARRUDA, I. K. G.; LEAL, M. C. C.; SANTO, A. C. G. E. Envelhecimento, obesidade e consumo alimentar em idosos. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v.10, n.2, p.231-242, 2007.

MARQUES, T. M.; WALL, R.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; RYAN, C. A.; STANTON, C. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.21; p.149-156, 2010.

MARRA, M.; SCALFI, L.; CONTALDO, F.; PASANISI, F. Fasting respiratory quotient as a predictor of long-term weight changes in non-obese women. **Ann. Nutr. Metab.**, v.48, n.3, p189-192, 2004.

MARTINEZ, I.; WALLACE, G.; ZHANG, C.; LEGGE, R.; BENSON, A. K.; CARR, T. P.; MORIYAMA, E. N.; WALTER, J. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.75, p.4175–4184, 2009.

MAXFIELD, E.; KONISHI, F. Patterns of food intake and physical activity in obesity. **J. Am. Diet Assoc.**, p. 49-406, 1966.

MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v.489, n. 7415, p.231–241, 2012.

- MCCRACKEN, V. J.; LORENZ, R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cell Microbiol.**, v.3, n.1, p.1-11, 2001.
- MCLAREN, L. Socioeconomic status and obesity. **Rev. Epidemiol.**, v.29, n.1, p.29-48, 2007.
- MENDONÇA, C. P.; ANJOS, L. A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, v.20, n.3, p.698-709, 2004.
- MILES, R. J.; NICHOLAS, R. A. J. **Methods in molecular biology Mycoplasma protocols.** Totowa, NJ: Humana Press, 1998. p.5
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Caderno de atenção básica: Obesidade.** N°.12. Brasília, 2006.
- MONDINI, L., MONTEIRO, C. A. Relevância epidemiológica da desnutrição e da obesidade em distintas classes sociais: métodos de estudo e aplicação à população brasileira. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.1, n.1, p.28-39, 1998.
- MONTALTO, M.; D'ONOFRIO, F.; GALLO, A.; CAZZATO, A.; GASBARRINI, G. Intestinal microbiota and its functions. **Dig. Liver. Dis.**, v.3, n.2, p.30-34, 2009.
- MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L. A tendência secular da obesidade segundo os estratos sociais: Nordeste e Sudeste do Brasil, 1975-1989-1995. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.43, p.186-194, 1999.
- MONTEIRO, C. A.; CONDE, W.L.; POPKIN, B. M. The burden of disease from undernutrition and overnutrition in countries undergoing rapid nutrition transition: a view from Brazil. **Am. J. of Public Health**, v.94, p.433-434, 2004.
- MORAN, C. P.; SHANAHAN, F. Gut microbiota and obesity: Role in etiology and potential therapeutic target. **Gastroenterology**, v.28, n.4, p.585–597, 2014.
- MORELLI, L. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. **J Nutr.**, v. 138, p.1791–1795, 2008.
- MORENO-INDIAS, I.; FERNANDO CARDONA, F.; FRANCISCO J.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO, M. I. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Front. Microbiol.**, v.5, n.190, 2014.
- MOROWITZ, H. J. Foreword: from the enigmatic pleuropneumonia-like organisms to the paradigmatic mycoplasma. IN: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Eds.). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.** New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 210.
- MUCCIOLI, G. G.; NASLAIN, D.; BACKHED, F.; REIGSTAD, C. S.; LAMBERT, D. M.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. **Mol. Syst. Biol.**, v.6, n.392, 2010.
- MURPHY, E. F.; COTTER, P. D.; HEALY, S.; MARQUES, T. M.; O'SULLIVAN, O.; FOUHY, F.; CLARKE, S. F.; O'TOOLE, P. W.; QUIGLEY, E. M.; STANTON, C.; ROSS, P. R.; O'DOHERTY, R. M.; SHANAHAN, F. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. **Gut**, v. 59, n.12, p. 1635–1642, 2010.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R; CASSADER, M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. **Annu. Rev. Med.**, v.62, p.361-80, 2011.
- NADAL, I.; SANTACRUZ, A.; MARCOS, A.; WARNBERG, J.; GARAGORRI, J. M.; MORENO, L. A.; MARTIN-MATILLAS, M.; CAMPOY, C.; MARTI, A.; MOLERES, A.; DELGADO, M.; VEIGA, O. L.; GARCIA-FUENTES, M.; REDONDO, C.G.; SANZ, Y. 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.

**National Committee for Clinical Laboratory Standards-USA** (NCCCLS, 2007)-Disponível em: [www.clsi.org](http://www.clsi.org)> Acessado em: 25/04/2015.

NEIMARK, H. C. Origins and evolution of wall-less prokaryotes. In: MADOFF, S. (Ed.). **The bacterial L- forms**. New York: Marcel Dekker, p. 21-42, 1986.

NEUMARK-SZTAINER, D.; WALL, M.; GUO, J.; STORY, M.; HAINES, J.; EISENBERG, M. Obesity, Disordered Eating and Eating Disorders in a Longitudinal Study of Adolescents: How Do Dieters Fare 5 Years Later? **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 106, p. 559-569, 2006.

NEUMARK-SZTAINER, D.; WALL, M.; STORY, M.; HAINES, J.; EISENBERG, M. Why does dieting predict weight gain in adolescents? Findings from project EAT-II: a 5-year longitudinal study. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 107, p. 448-455, 2007.

NICHOLSON, J. K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. **Molecular Systems Biology**, v.2, n.52, 2006.

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v.98, n. 30; p.694-702, 1990.

OLSHANSKY, S. J.; PASSARO, D. J.; HERSHOW, R.C; LAYDEN, J.; CARNES, B. A.; BRODY, J. et al. A Potential Decline in Life Expectancy in the United States in the 21<sup>st</sup> Century. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 11, p. 1138-1145; 2005.

OLSON, L. D. et al. Arginine utilization by Mycoplasma fermentans is not regulated by glucose metabolism: a 13C-NMR study. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 108, n. 1, p. 47-52, 1993.

OTTMAN, N.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M.; BELZER, C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.2, n.104, 2012.

PALMER, C.; BIK, E.M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A.; BROWN, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biol.** v.5, p.177, 2007.

PENDERS, J.; THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v.118, n.2, p.511-21, 2006.

PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHA JÚNIOR, A. H. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.47, n.2, p.111-127, 2003.

PEREIRA, L.S.S.; PINTO, R.C.P.; AZEVEDO, V.; MUZI, V. R.; QUINTÃO, D. F. Relação entre perfil antropométrico e a ingestão dietética em pacientes atendidos na clínica escola da faculdade pitágoras, campus Ipatinga-mg. **RBONE**, v.6, n.31, p.4-12, 2012.

PEREIRA, M. A.; JACOBS, D. R. J.; VAN HORN, L.; SLATTERY, M. L.; KARTASHOV, A. I.; LUDWIG, D. S. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study. **JAMA**, v.287, n.16, p.2081-9, 2002.

PEREIRA, S. S.; TEIXEIRA, L.G.; AGUILAR, E.C.; MATOSO, R.O.; SOARES, F.L.; FERREIRA, A.V.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in c57bl/6 and apoe-/- mice fed high fat diet. **Anim. Sci. J.**, v.83, p.549-555, 2012.

PINHEIRO, A. B. V.; LACERDA, E. M.; BENZECRY, E. H.; GOMES, M. C. S; COSTA, V. M. **Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

POPKIN, B. M. Global nutritional dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. **Am. J. Clinical Nutrition**, v.54, n.2, p.289-298, 2006.

POROYKO, V.; WHITE, J. R.; WANG, M.; DONOVAN, S.; ALVERDY, J.; LIU, D. C.; MOROWITZ, M. J. Gut microbial gene expression in mother-fed and formula-fed piglets. **PLoS One**, v.5, p.124-159, 2010.

PRINCE, A. L.; ANTONY, K. M.; MA, J.; AAGAARD, K. M. The microbiome and development: a mother's perspective. **Semin. Reprod. Med.**, v.32, n.1, p.14-22, 2014.

PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocr. Rev.**, v.24, p.78-90, 2003.

PURCHIARONI, F.; TORTORA, A.; GABRIELLI, M.; BERTUCCI, F.; GIGANTE, G.; IANIRO, G.; OJETTI, V.; SCARPELLINI, E.; GASBARRINI, A. The role of intestinal microbiota and the immune system. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.17, p.323-33, 2013.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J. M.; HANSEN, T.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; YINGRUI LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; CONSORTIUM, M.; BORK, P.; EHRlich, S.D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomics sequencing. **Nature**, v.464, p.59-65, 2010.

QUIGLEY, E. M. Gut bacteria in health and disease. **Gastroenterol. Hepatol.** v.9, n.9, p. 560-569, 2013.

RABEN, A.; ASTRUP, A. Leptin is influenced body by predisposition to obesity and diet composition. **Int. J. Obes.**, v.24, n.4, p.450-459, 2000.

RABOT, S.; MEMBREZ, M.; BRUNEAU, A.; GERARD, P.; HARACH, T.; MOSER, M.; RAYMOND, F.; MANSOURIAN, R.; CHOU, C. J. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. **FASEB J.**, v.24, p.4948-4959, 2010.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. **Environ. Microbiol.**, v.9, n.9, p.2125-2136, 2007.

RAKOFF-NAHOUM, S.; PAGLINO, J.; ESLAMI-VARZANEH, F.; EDBERG, S.; MEDZHITOV, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v.118, n.33, p.229-241 33, 2004.

RAMALHO, R.; GUIMARAES, C. The role of adipose tissue and macrophages in chronic inflammation associated with obesity: Clinical implications. **Acta. Med. Port.**, v.21, n. 76, p. 489-496, 2008.

RAOULT, D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.27, n.8, p.631-634, 2008.

RAUTAVA, S.; LUOTO, R.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v.9, p. 565–576, 2012.

RAZIN, S. Molecular properties of Mollicutes: a synopsis. In: RAZIN, S. TULLY, J. G. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. Academic Press, INC. v. 1, p. 1-25, 1995.

RAZIN, S. Mycoplasma Taxonomy and Ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 3-22.

RAZIN, S.; JACOBS, E. Mycoplasma adhesion. **J. Gen. Microbiol.**, v.138, n.3, p.407-422, 1992.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. Mycoplasma characterization. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G (Eds.). **Methods in Mycoplasmaology**. New York: Academic Press, p. 150-176, 1983.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 52, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

REGIDOR, E.; GUITIERREZ-FISAC, J. L.; BANEGAS, J. R.; LOPES-GARCIA, E.; RODRIGUES-ARTALEJO, F. Obesity and socioeconomic position measured at three stages of the life course in elderly. **Eur. J. Clin. Microbiol.** v.58, p.488-494, 2004.

REMELY, M.; DWORZAK, S.; HIPPE, B.; ZWIELEHNER, J.; AUMÜLLER, E.; BRATH, H.; HASLBERGER, A.G. Abundance and diversity of microbiota in type 2 diabetes and obesity. **Diabetes metab. res.**, v. 4, p.1-8, 2013.

REMELY, M.; TESAR, I.; HIPPE, B.; GNAUER, S.; RUST, P.; HASLBERGER, A.G. Gut microbiota composition correlates with changes in body fat content due to weight loss. **Beneficial Microbes.**, v.6, n.4, p.431-439, 2015.

RENZ-POLSTER, H.; DAVID, M. R.; BUIST, A. S.; VOLLMER, W. M.; O'CONNOR, E. A.; FRAZIER, E. A.; WALL, M. A. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. **Clin. Exp. Allergy.**, v.35, n.11, p.1466-1472, 2005.

RESTA, S. C. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. **J. Physiol.** v. 587, p. 4169–4174, 2009.

RODWELL, A. W.; MITCHELL, A. Nutrition, growth and reproduction. In: **The Mycoplasmas**, v.1, p.103-139, BARILE; S. RAZIN (eds). New York:Academic Press. 1983.

ROGERS, M. J. et al. Construction of the mycoplasma evolutionary tree from 5S rRNA sequence data. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 82, n. 4, p. 1160-1164, 1985.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/30522>>.

RUHNKE, H. L.; ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. (Eds). **Mycoplasmosis in animals: Laboratory Diagnosis**. Ames: Iowa State University, p.141-144, 1994.

SANTACRUZ, A.; MARCOS, A.; WARNBERG, J.; MARTI, A.; MARTIN-MATILLAS, M.; CAMPOY, C.; MORENO, L. A.; VEIGA, O.; REDONDO-FIGUERO, C.; GARAGORRI, J. M.; AZCONA, C.; DELGADO, M.; GARCIA-FUENTES, M.; COLLADO, M. C.; SANZ, Y. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. **Obesity**, v.17, p.1906–1915, 2009.

SANTOS, C. R. B.; PORTELLA, E. S.; AVILA, S. S.; SOARES, E. A.; Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Rev. Nutr.**, v.19, n.3, 2006.

SANZ, Y.; SANTACRUZ, A.; DE PALMA, G. Insights into the role of gut microbes in obesity. **Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.**, v.2008; 2008.

SATOKARI, R.; GRONROOS, T.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.48, n.1, 2009.

SAWAYA, A. L.; SOLYMOS, G. M. B.; FLORÊNCIO, T. M. M. T.; MARTINS, P. A. Os dois Brasis: quem são, onde estão e como vivem os pobres brasileiros. **Estudos Avançados**, v.17, n.48, p.21-44, 2003.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, v.130, p.2073-2085, 2000.

SCARPELLINI, E.; CAMPANALE, M.; LEONE, D.; PURCHIARONI, F.; VITALE, G.; LAURITANO, E. C.; GASBARRINI, A. Gut microbiota and obesity. **Intern. Emerg. Med.**, v.5, sup. I, p.S53-S56, 2010.

SCHÉLE, E.; GRAHNEMO, L.; ANESTEN, F.; HALLÉN, A.; BÄCKHED, F.; JANSSON, J.O. The Gut Microbiota Reduces Leptin Sensitivity and the Expression of the Obesity-Suppressing Neuropeptides Proglucagon (Gcg) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) in the Central Nervous System. **Endocrinology**, v.154, n.10, p. 3643–3651, 2013.

SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; SCHÄFER, K.; BEIJER, S.; BOS, N. A.; DONUS, C.; HARDT, P. D. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, v.18, n.1, p. 190–195, 2010.

SEARS, M. E.; GENUIS, S. J. Review Article: Environmental Determinants of Chronic Disease and Medical Approaches: Recognition, Avoidance, Supportive Therapy, and Detoxification. **J. Environ. Public Health**, v.2012, 2012.

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

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

SHERIDAN, P. O.; BINDELS, L. B.; SAULNIER, D. M. et al. Can prebiotics and probiotics improve therapeutic outcomes for undernourished individuals? **Gut Microbes**, v.5, p.74–82, 2014.

SILVA, L. F.G. **Disbiose intestinal: conheça as causas e os tratamentos**. 2001.

SILVA, R. S. Indicações cirúrgicas no tratamento da obesidade. In: SILVA, R. S.; KAWAHARA, N. T. **Cuidados pré e pós-operatório na cirurgia da obesidade**. **AGE**, p. 60-64, 2005.

SMITH, M. I.; YATSUNENKO, T.; MANARY, M. J. et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. **Science**, v.339, n.13, p.548–54, 2013.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. Departamento de Aterosclerose. IV Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.88, n.1, 2007.

SOUZA, D. R.; ANJOS, L. A.; WAHRLICH, V. VASCONCELLOS, M. T. L.; MACHADO, J. M. Ingestão alimentar e balanço energético da população adulta de Niterói, Rio de Janeiro,

Brasil: resultados da Pesquisa de Nutrição, Atividade Física e Saúde (PNAFS). **Cad. Saúde Pública**, v. 26, n.5, p.879-890. 2010.

SOWERS, M. F.; ZHENG, H.; TOMEY, K.; KARVONEN-GUTIERREZ, C.; JANNAUSCH, M.; LI, X.; YOSEF, M.; SYMONS, J. Changes in body composition in women over six years at middle life: ovarian and chronological aging. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.92, p.895- 901, 2007.

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.; BERTOLAMI, M.C.; AFIUNE NETO, A.; SOUZA, A.D.; et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Brazilian Guideline for dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.88, n.1, p.12-19, 2007.

STERNFELD, B.; WANG, H.; QUEENSBERRY, C.P. J. R.; ABRAMS, B.; EVERSON-ROSE, S. A.; GREENDALE, G. A.; MATTHEWS, K. A.; TORRENS, J. I.; SOWERS, M. Physical activity and changes in weight and waist circumference in midlife women: findings from the study of women's Health across the nation. **Am. J. Epidemiol.**, v.160, p.912-222, 2004.

STEWART, S.T.; CUTLER, D.M.; ROSEN, A.B. Forecasting the Effects of Obesity and Smoking on U.S. Life Expectancy. **N. Engl. J. Med.**, v.361, p.2252-2260, 2009.

SULLIVAN, A.; EDLUND, C.; NORD, C. E. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. **Am. J. Gastroenterol.**, v.95, p. 8-10, 2000.

TACO- **Tabela Brasileira de composição de alimentos**. Versão II. 2. ed. Campinas, Sp: Nepa- Unicamp, 2006.

TENNYSON, C. A.; FRIEDMAN, G. Microecology, Obesity and Probiotics. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, v. 15, p. 422-427, 2008.

TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v.489, p.242–249, 2012.

TSUKUMO, D. M; CARVALHO, B. M.; CARVALHO-FILHO, M. A.; SAAD, M. J. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** v.53, p.139–144, 2009.

TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mollicutes. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. Academic Press. v.1, p. 33–39, 1995.

TURNBAUGH, P. J.; BACKHED, F.; FULTON, L.; GORDON, J. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. **Cell Host & Microbe**, v.3, p.213–223, 2008.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. P.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH, A.C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n.7228, p. 480-485, 2009.

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

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN DER LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; QUINT, W. G. V.; NIESTERS, J. M.; GALAMA, J. M. D.; MELCHERS, W. J. G. Genus and Species-Specific Identification of Mycoplasmas by 16S rRNA Amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 2606-2615, 1992.

VAN VLIET, M. J.; HARMSSEN, H. J. M.; DE BONT, E.S. J. M.; TISSING, W. J. E. The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **PLoS Pathog.**, v.6, n.5, 2010.

VEIGA, G. V.; SICHIERI, R. Correlation in food intake between parents and adolescents depends on socioeconomic level. **Rev. Nutr. Res.**, v.26, p. 517-523, 2006.

VENTURA, M.; O'FLAHERTY, S.; CLAEISSON, M. J.; TURRONI, F.; KLAENHAMMER, T. R.; VAN SINDEREN, D.; O'TOOLE, P. W. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.7, n.1; p.61-71, 2008.

VERDAM, F. J.; FUENTES, S.; JONGE, C.; ZOETENDAL, E. G.; ERBIL, R.; GREVE, J. W.; BUURMAN, W. A.; DE VOS, W. M.; RENSEN, S. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. **Obesity**, v.21, n.12, p. 607–615, 2013.

VILLANUEVA-MILLÁN, M. J.; PÉREZ-MATUTE, P.; OTEO, J. A. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. **J. Physiol. Biochem.**, v.22, n.15, p. 507–515, 2015

VOELKER, L. L.; DYBVIG, K. Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis*: transformation, conjugal transfer of Tn916, and evidence for a restriction system recognizing AGCT. **J. Bacteriol.**, v.178, n.20, p.6078-6081, 1996.

VRIEZE, A.; HOLLEMAN, F.; ZOETENDAL, E.G.; DE VOS, W.M.; HOEKSTRA, J.B.; NIEUWDORP, M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition, **Diabetologia**, v.53, n.4, p. 606-613, 2010.

WAITES, K. B.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; MARRIOTT, P. A.; DAVIS, R. O.; CASSELL, G. H. **Current. Microbiology.**, v. 15, p. 325-327, 1987.

WALKER, A. W.; INCE, J.; DUNCAN, S. H.; WEBSTER, L. M.; HOLTROP, G.; ZE, X.; BROWN, D.; STARES, M. D.; SCOTT, P.; BERGERAT, A.; LOUIS, P.; MCINTOSH, F.; JOHNSTONE, A. M.; LOBLEY, G. E.; PARKHILL, J.; FLINT, H. J. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. **ISME J.**, v. 5, p. 220–230, 2011.

WALTER, J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. **Appl. Environ Microbiol.**, v.74, n.16, p.4985-4986, 2008.

WEATHERILL, A.R.; LEE, J. Y.; ZHAO, L.; LEMAY, D.G.; YOUN, H. S.; HWANG, D.H. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through tlr4. **J. Immunol.**, v. 174, n. 70, p.5390-5397, 2005.

WEISBURG, W. G. et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 12, p. 6455-6467, 1989.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: situation and trends. Geneva (CH): **World Health Organization**, 2014.

WICHMANN, A.; ALLAHYAR, A.; GREINER, T.U.; PLOVIER, H.; LUNDÉN, G.O.; ARSSON, T.; DRUCKER, D.J.; DELZENNE, N.M.; CANI, P.D.; BÄCKHED, F. Microbial Modulation of Energy Availability in the Colon Regulates Intestinal Transit. **Cell Host Microbe**, v.14, n.5, p.582-590, 2013.

WIESLANDER, A.; BOYER, M.; WRDBLEWSKI, H. Membrane protein structure. *In* **Mycoplasmas : Molecular Biology and Pathogenesis**, pp. 93-112. Edited by J. Maniloff,

R. N. McElhaney, L. R. Finch & J. B. Baseman. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1992.

WILSON, I.D.; NICHOLSON, J.K. The role of gut microbiota in drug response. **Curr. Pharm. Des.**, v.15, p.1519–1523, 2009.

WILSON, P. W.; D'AGOSTINO, R. B.; SULLIVAN, L.; PARISE, H.; KANNEL, W. B. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. **Arch. Intern. Med.**, v.9, n16, p.1867-1872, 2002.

WOLEVER, T. M.; SPADAFORA, P.; ESHUIS, H. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.53, n.3, 681-687, 1991.

WONG, J. M.; ESFAHANI, A.; SINGH, N.; VILLA, C. R.; MIRRAHIMI, A.; JENKINS, D. J.; KENDALL, C. W. Gut microbiota, diet, and heart disease. **J. AOAC Int.**, v.95, p.24–30, 2012.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet Nutrition and the prevention of chronic Diseases**. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. GENEVA 2003- WHO Technical Report Series n°916, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: World Health Organization; 2002.

WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y. Y.; KEILBAUGH, S. A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; SINHA, R.; GILROY, E.; GUPTA, K.; BALDASSANO, R.; NESSEL, L.; LI, H.; BUSHMAN, F. D.; LEWIS, J.D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, n.33, p.105–108, 2011.

XIAO, S.; FEI, N.; PANG, X.; SHEN, J.; WANG, L.; ZHANG, B.; ZHANG, M.; ZHANG, X.; ZHANG, C.; LI, M.; SUN, L.; XUE, Z.; WANG, J.; FENG, J.; YAN, F.; ZHAO, N.; LIU, J.; LONG, W.; ZHAO, L. A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.87, n.2, p.357–367, 2014.

XU, J.; GORDON, J. I. Honor thy symbionts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.100, n.18, p.10452-10459, 2003.

YANG, L.; LU, X.; NOSSA, C. W.; FRANCOIS, F.; PEEK, R. M.; PEI, Z. Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome. **Gastroenterology**, v. 137, n.2, p.588–597, 2009.

ZAIBI, M. S.; STOCKER, C. J.; O'DOWD, J.; DAVIES, A.; BELLAHCENE, M.; CAWTHORNE, M. A.; BROWN, A. J.; SMITH, D. M.; ARCH, J. R. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. **FEBS**, v.584, p.2381–2386, 2010.

ZHANG, H.; DIBIASE, J. K.; ZUCCOLO, A.; KUDRNA, D.; BRAIDOTTI, M.; YU, Y.; PARAMESWARAN, P.; CROWELL, M. D.; WING, R.; RITTMANN, B. E.; KRAJMALNIK-BROWNA, R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.106, n.7, p. 2365–2370, 2009.

ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M. A microbial world within us. **Mol. Microbiol.**, v.59, n.6, p.1636-1650, 2006.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Universidade de São Paulo

Instituto de Ciências Biomédicas

---

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**ESTUDO: Avaliação da participação dos microrganismos da Classe Mollicutes na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas.**

*Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.*

---

Eu, \_\_\_\_\_, profissão \_\_\_\_\_,  
residente \_\_\_\_\_ e domiciliado \_\_\_\_\_ na

\_\_\_\_\_, portador da Cédula de identidade, RG \_\_\_\_\_, e inscrito no CPF/MF \_\_\_\_\_ nascido(a) em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "***Avaliação da participação dos microrganismos da Classe Mollicutes na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas***". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada vaginose bacteriana a ser estudada no projeto "***Avaliação da participação dos microrganismos da Classe Mollicutes na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas***";
- II) Serão feitas uma coleta de 5ml de sangue e fezes, em período único.
- III) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;

- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

- VIII) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.

Sim ou  Não

- IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -, no Fone 3091.7733 (e-mail: *cep@icb.usp.br*) ou (11 3091-7297 *joti@usp.br*) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE- apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Paciente /  Responsável .....

**Testemunha 1 :** \_\_\_\_\_

Nome / RG / Telefone:

**Testemunha 2 :** \_\_\_\_\_

Nome / RG / Telefone:

**Responsável pelo Projeto:** \_\_\_\_\_

**PROF. DR. JORGE TIMENETSKY**

**APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA**

**Seção 1: IDENTIFICAÇÃO E DADOS PESSOAIS**

<b>Nome:</b>	<b>Idade</b>	<b>ID:</b>
<b>Telefone:</b>	<b>Data:</b>	
<b>Profissão:</b>		
<b>Estado civil:</b> 1. <input type="checkbox"/> Casada 2. <input type="checkbox"/> Solteira 3. <input type="checkbox"/> Mora com companheiro 4. <input type="checkbox"/> Viúva 5. <input type="checkbox"/> Divorciada		
<b>Raça/cor:</b> 1. <input type="checkbox"/> Branca 2. <input type="checkbox"/> Preta 3. <input type="checkbox"/> Amarela 4. <input type="checkbox"/> Parda 5. <input type="checkbox"/> Indígena		
<b>Escolaridade:</b> 1. <input type="checkbox"/> Analfabeto      2. <input type="checkbox"/> 1º grau incompleto      3. <input type="checkbox"/> 1º grau Completo		
4. <input type="checkbox"/> 2º grau incompleto      5. <input type="checkbox"/> 2º grau completo      6. <input type="checkbox"/> Superior incompleto      7. <input type="checkbox"/> superior completo		

**Condição Socioeconômica:** Indicar aproximadamente a renda domiciliar/familiar mensal (soma de todos os ganhos das pessoas que dividem as despesas) (valor SM R\$ 678,00)

- 1 salário mínimo (até R\$ 618,00)
- 1 a 2 salários mínimos (mais de R\$ 618,00 a R\$ 1.236,00)
- 2 a 5 salários mínimos (mais de R\$ 1.236,00 a R\$ 3.090,00)
- 5 a 10 salários mínimos (mais de R\$ 3.090,00 a R\$ 6.180,00)
- mais de 10 salários mínimos (mais de R\$ 6.180,00)

**Seção 2: HISTÓRIA FAMILIAR (parentes de 1º grau paternos e maternos e irmãos)**

1.  H.A.S      2.  Diabetes      3.  Obesidade      4.  Hipercolesterolemia      5.  DCV

**Seção 3: HISTÓRIA CLÍNICA**

<p><b>Alterações gastrointestinais:</b> 1. <input type="checkbox"/> Constipação . <input type="checkbox"/> Flatulência 3. <input type="checkbox"/> Refluxo 4. <input type="checkbox"/> Azia</p> <p>5. <input type="checkbox"/> Úlcera 6. <input type="checkbox"/> Gastrite 7. <input type="checkbox"/> Náuseas 8. <input type="checkbox"/> Vômitos</p>
<p><b>Como o intestino se comporta habitualmente:</b> 1. <input type="checkbox"/> Normal 2. <input type="checkbox"/> Constipação 3. <input type="checkbox"/> Diarréia</p>
<p><b>Moléstia atual:</b> 1. <input type="checkbox"/> H.A.S 2. <input type="checkbox"/> Diabetes 3. <input type="checkbox"/> Obesidade 4. <input type="checkbox"/> Hipercolesterolemia</p> <p>5. <input type="checkbox"/> DCV 6. <input type="checkbox"/> Dispneia 7. <input type="checkbox"/> Alteração Menstrual</p>
<p><b>Uso de laxantes:</b> 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não</p>
<p><b>Seção 4: HISTÓRIA OBSTÉTRICA</b></p>
<p><b>Tipo de parto:</b> 1. <input type="checkbox"/> Normal 2. <input type="checkbox"/> Cesárea</p>
<p><b>Foi amamentada:</b> 1. <input type="checkbox"/> Não 2. <input type="checkbox"/> 1 a 3 meses 3. <input type="checkbox"/> 4 a 6 meses 4. <input type="checkbox"/> 7 a 9 meses</p> <p>5. <input type="checkbox"/> 10 a 12 meses 6. <input type="checkbox"/> &gt;12 meses</p>
<p><b>Teve alguma gestação:</b> 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não</p>
<p><b>Quantos filhos:</b> 1. <input type="checkbox"/> 1 a 2 2. <input type="checkbox"/> 3 a 4 3. <input type="checkbox"/> ≥5</p>
<p><b>Quantos partos foram normais:</b> 1. <input type="checkbox"/> 1 a 2 2. <input type="checkbox"/> 3 a 4 3. <input type="checkbox"/> ≥5</p>
<p><b>Quantos partos foram cesárea:</b> 1. <input type="checkbox"/> 1 a 2 2. <input type="checkbox"/> 3 a 4 3. <input type="checkbox"/> ≥5</p>
<p><b>Tempo de amamentação dos filhos:</b> 1. <input type="checkbox"/> Não 2. <input type="checkbox"/> 1 a 3 meses 3. <input type="checkbox"/> 4 a 6 meses 4. <input type="checkbox"/> 7 a 9 meses</p> <p>5. <input type="checkbox"/> 10 a 12 meses 6. <input type="checkbox"/> &gt;12 meses</p>

<p><b>Seção 5: HISTÓRIA GINECOLÓGICA</b></p>
<p><b>Usou ou está usando algum anticoncepcional (adesivo, pílula, anel vaginal, DIU de hormônio, injetável ou bastão subcutâneo):</b> 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não</p>
<p><b>Com que idade começou a tomar:</b></p>
<p><b>Parou de usar por algum tempo:</b></p>
<p><b>Por quanto tempo parou:</b></p>
<p><b>Seção 6: CONSUMO DE TABACO</b></p>

<p><b>Já fumou mais de 20 maços de cigarro (cachimbo ou charuto) em toda sua vida?</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Não 2. <input type="checkbox"/> Sim, e fumo atualmente 3. <input type="checkbox"/> Sim, mas parei de fumar 4. <input type="checkbox"/> Não sabe, não informa</p>
<p><b>Se fuma/fumou, o faz há quanto tempo ?</b></p>
<p><b>Quantos cigarros em média fuma/fumava por dia?</b></p> <p>___ cigarros</p> <p>___ cachimbos</p> <p>___ charutos</p>
<p><b>Se parou de fumar, há quanto tempo ocorreu?</b></p>
<p><b>Seção 7: CONSUMO DE ÁLCOOL</b></p>
<p><b>Etilista:</b> 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não</p>
<p><b>Frequencia de ingestão:</b></p>
<p><b>Tipo de bebida ingerida:</b></p>
<p><b>Há quanto tempo ingere:</b></p>
<p><b>Seção 8: ATIVIDADE FÍSICA (IPAQ versão curta)</b></p>

As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim.

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal
- 

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez:

**1a** Em quantos dias da última semana você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício? dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**1b** Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**? horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

**2a.** Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar volei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**) dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**2b.** Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

**3a** Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração. dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**3b** Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

### Seção 9: HÁBITOS ALIMENTARES

Você mudou seus hábitos alimentares recentemente ou está fazendo dieta para emagrecer ou por qualquer outro motivo?

- |  |   |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> Não                        | 5. <input type="checkbox"/> Sim, para redução de sal        |
| 2. <input type="checkbox"/> Sim, para perda de peso    | 6. <input type="checkbox"/> Sim, para redução de colesterol |
| 3. <input type="checkbox"/> Sim, por orientação médica |   |

4.  Sim, para dieta vegetariana ou redução do consumo de carne

Você está tomando algo para suplementar sua dieta (vitaminas, minerais e outros produtos)?

1.  Não 2.  Sim, regularmente 3.  Sim, mas não regularmente

Se a resposta da pergunta anterior for sim, favor preencher o quadro abaixo:

Suplemento	Nome comercial	Dose	Frequencia

Número de refeições que costuma fazer por dia:

Costuma fazer desjejum diariamente: 1.  Sim 2.  Não

Costuma "beliscar" entre as refeições: 1.  Sim 2.  Não

Costuma ingerir líquidos durante as refeições: 1.  Sim 2.  Não

Quantas refeições costuma fazer fora de casa por semana:

Em que local costuma fazer as refeições fora de casa:

1.  Restaurantes 5.  Não faz

2.  Lanches rápidos 6.  Outro

3.  Marmita

4.  No trabalho

As questões seguintes relacionam-se ao seu hábito alimentar usual no PERÍODO DE UM ANO. Para cada quadro responda, por favor, a frequência que melhor descreva QUANTAS VEZES você costuma comer cada item e a respectiva UNIDADE DE TEMPO (se por dia, por semana, por mês ou no ano). Depois responda qual a sua PORÇÃO INDIVIDUAL USUAL em relação à porção média indicada. ESCOLHA SOMENTE UM CÍRCULO PARA CADA COLUNA. Muitos grupos de alimentos incluem exemplos. Eles são sugestões e você pode consumir todos os itens indicados. Se você não come ou raramente come um determinado item, preencha o círculo da primeira coluna (N=nunca come). NÃO DEIXE ITENS EM BRANCO.

GRUPO DE ALIMENTOS	Com que frequência você costuma comer?		Qual o tamanho de sua porção em relação à porção média?	
	QUANTAS VEZES VOCÊ COME:	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Alimentos e preparações	Número de vezes: 1, 2, 3, etc. (N = nunca ou raramente comeu no último ano)	D=por dia S=por semana M=por mês A=por ano	Porção média de referência	P = menor que a porção média M = igual à porção média G = maior que a porção média E = bem maior que a porção média

SOPAS E MASSAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Sopas (de legumes, canja, creme, etc)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 concha média (150g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Salgados fritos (pastel, coxinha, rissólis, bolinho)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade grande (80g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Salgados assados (esfiha, bauruzinho, torta)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 unidades ou 2 pedaços médios (140g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Macarrão com molho sem carne	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 prato raso (200g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Macarrão com molho com carne, lasanha, nhoque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 escumadeira ou 1 pedaço pequeno (110g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Pizza, panqueca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 fatias pequenas ou 2 unidades (180g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Polenta cozida ou frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 colheres de sopa ou 2 fatias pequenas (70g)	P M G E ○ ○ ○ ○

CARNES E PEIXES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Carne de boi (bife, cozida, assada), miúdos, vísceras	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 bife médio ou 2 pedaços (100g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Carne de porco (lombo, bisteca)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 fatia média (100g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Carne seca, carne de sol, bacon	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 pedaços pequenos (40g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Linguiça	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 gomo médio (60g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Embutidos (presunto, mortadela, salsicha)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 fatias médias (30g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Frango (cozido, frito, grelhado, assado)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 pedaço ou 1 filé pequeno (60g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Hambúrguer, nuggets, almôndega	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade média (60g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Peixe (cozido, frito, assado) e frutos do mar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 filé pequeno ou 1 posta pequena (100g)	P M G E ○ ○ ○ ○

LEITE E DERIVADOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Leite - tipo: ( ) integral ( ) desnatado ( ) semi-desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1/2 copo requeijão (125ml)	P M G E ○ ○ ○ ○
iogurte - tipo: ( ) natural ( ) com frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade pequena (140g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Queijo mussarela, prato, parmesão, provolone	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 1/2 fatias grossas (30g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Queijo minas, ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 fatia média (30g)	P M G E ○ ○ ○ ○

LEGUMINOSAS E OVOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Ovo (cozido, frito)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade (50g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Feijão (carioca, roxo preto, verde)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 concha média (86g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Lentilha, ervilha seca, grão de bico, soja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 colher de servir (35g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Feijoada, feijão tropeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 concha média (210g)	P M G E ○ ○ ○ ○

ARROZ E TUBÉRCULOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Arroz branco ou integral cozido com óleo e temperos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 escumadeiras médias (120g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Batata frita ou mandioca frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 colheres de servir cheias (100g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Batata, mandioca, inhame (cozida ou assada), purê	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 escumadeira cheia (90g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Salada de maionese com legumes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	3 colheres de sopa (90g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Farinha de mandioca, farofa, cuscut, aveia, tapioca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	3 colheres de sopa (40g)	P M G E ○ ○ ○ ○

VERDURAS E LEGUMES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Alface	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	3 folhas médias (30g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	3 fatias médias (40g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Cenoura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 colher de sopa (25g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Outros legumes (abobrinha, berinjela, chuchu, pepino)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 colher de sopa cheia (30g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Outras verduras cruas (acelga, rúcula, agrião)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 prato de sobremesa (38g)	P M G E ○ ○ ○ ○

VERDURAS E LEGUMES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Outras verduras cozidas (acelga, espinafre, escarola, couve)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 colher de servir (30g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Brócolis, couve-flor, repolho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 ramo ou 2 colheres de sopa (30g)	P M G E ○ ○ ○ ○

MOLHOS E TEMPEROS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Óleo, azeite ou vinagrete para tempero de salada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 fio (5ml)	P M G E ○ ○ ○ ○
Maionese, molho para salada, patê, chantilly	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 colher de chá (4g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Sal para tempero de salada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 pitada (0,35g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Condimentos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 pitada (0,35g)	P M G E ○ ○ ○ ○

FRUTAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Laranja, mexerica, abacaxi	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade média ou 1 fatia grande (180g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade média (86g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Maçã, pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade média (110g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Melão, melancia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 fatia média (150g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Mamão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 fatia média ou ½ unidade média (160g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Goiaba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade grande (225g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Abacate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 colheres de sopa cheias (90g)	P M G E ○ ○ ○ ○

BEBIDAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Suco natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1/2 copo americano (80ml)	P M G E ○ ○ ○ ○
Suco industrializado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 copo de requeijão (240ml)	P M G E ○ ○ ○ ○
Café ou chá sem açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 xícaras de café (90ml)	P M G E ○ ○ ○ ○
Café ou chá com açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 xícaras de café (90ml)	P M G E ○ ○ ○ ○
Refrigerante ( ) comum ( ) diet/light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 copo de requeijão (240ml)	P M G E ○ ○ ○ ○
Cerveja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 latas (700ml)	P M G E ○ ○ ○ ○

PÃES E BISCOITOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Pão francês, pão de forma, integral, pão doce, torrada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 unidade ou 2 fatias (50g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Biscoito sem recheio (doce, salgado)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	4 unidades (24g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Biscoito recheado, waffer, amanteigado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	3 unidades (41g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Bolo (simples, recheado)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 fatia média (60g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Manteiga ou margarina passada no pão ( ) comum ( ) light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	3 pontas de faca (15g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Sanduíche (cachorro-quente, hambúrguer)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 unidades simples (220g)	P M G E ○ ○ ○ ○

DOCES E SOBREMESAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Chocolate, bombom, brigadeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 barra pequena (25g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Achocolatado em pó (adicionado ao leite)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	2 colheres de sopa (25g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Sobremesas, doces, tortas e pudins	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1 pedaço ou 1 fatia média (60g)	P M G E ○ ○ ○ ○
Açúcar, mel, geléia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	D S M A ○ ○ ○ ○	1/2 colher de sopa (6g)	P M G E ○ ○ ○ ○

Por favor, liste qualquer outro alimento ou preparação importante que você costuma comer ou beber pelo menos UMA VEZ POR SEMANA que não foram citados aqui (por exemplo: leite-de-coco, outros tipos de carnes, receitas caseiras, creme de leite, leite condensado, gelatina e outros doces etc. ).

Alimento	Frequência por semana	Quantidade Consumida

**Quando você come carne bovina ou suína, você costuma comer a gordura visível?**

1.  nunca ou raramente 2.  algumas vezes 3.  sempre 4.  não sabe

**Quando você come frango ou peru, você costuma comer a pele?**

1.  nunca ou raramente 2.  algumas vezes 3.  sempre 4.  não sabe

<b>Seção 10: DADOS ANTROPOMÉTRICOS</b>		
<b>Peso</b>	_____ Kg	_____ Kg
<b>Estatura</b>	_____ m	_____ m
<b>IMC</b>	_____ Calcular IMC= peso em Kg/ altura em m <sup>2</sup>	
<b>Circunferência Abdominal</b>	_____ cm	_____ cm
<b>Reactância:</b>	<b>Resistência:</b> _____ %MG	_____ %MLG
<b>Peso MG</b> _____ kg	<b>Peso MGL</b> _____ kg	
<b>TMB:</b> _____	<b>% água de massa magra:</b>	

**APÊNDICE C- TABELA 10**

**Tabela 10:** Participação dos alimentos nos grupos, médias de consumo por dia dos alimentos consumidos pela população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

<b>Grupo Alimentar</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Grupo</b>	<b>Frequência diária (dp)</b>	<b>Frequência diária (amplitude)</b>
<b>Massas</b>	Macarrão com molho sem carne	<b>Caso</b>	0,2 (0,5)	(0-2,5)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,2)	(0-0,43)
	Macarrão com molho com carne, lasanha, nhoque	<b>Caso</b>	0,1 (0,12)	(0-0,43)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,2)	(0-0,79)
	Pizza, panqueca	<b>Caso</b>	0,15 (0,22)	(0-1)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,1)	(0,03-0,43)
<b>Preparação</b>	Sopas	<b>Caso</b>	0,15 (0,18)	(0-0,43)
		<b>Controle</b>	0,14 (0,2)	(0-0,43)
	Polenta cozida ou frita	<b>Caso</b>	0,03 (0,05)	(0-0,14)
		<b>Controle</b>	0,008 (0,03)	(0-0,14)
<b>Carne vermelha e ovos</b>	Carne bovina	<b>Caso</b>	0,6 (0,6)	(0,08-2,5)
		<b>Controle</b>	0,5 (0,18)	(0,14-0,79)
	Carne de porco	<b>Caso</b>	0,08 (0,09)	(0-0,43)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,5)	(0-2,5)
	Carne seca, carne do sol, bacon	<b>Caso</b>	0,06 (0,05)	(0-0,14)
		<b>Controle</b>	0,04 (0,06)	(0-0,14)
Ovos	<b>Caso</b>	0,2 (0,2)	(0-1)	
	<b>Controle</b>	0,3 (0,5)	(0-2,5)	
<b>Embutidos</b>	Linguiça	<b>Caso</b>	0,11 (0,09)	(0-0,43)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,5)	(0-2,5)
	Embutidos (presunto, mortadela, salsicha)	<b>Caso</b>	0,15 (0,23)	(0-1)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,2)	(0-0,43)
<b>Carne branca</b>	Frango	<b>Caso</b>	0,6 (0,9)	(0,03-3)
		<b>Controle</b>	0,5 (0,5)	(0,14-2,5)
	Peixe e frutos do mar	<b>Caso</b>	0,1 (0,1)	(0-0,43)
		<b>Controle</b>	0,1 (0,2)	(0-0,43)
<b>Leite e derivados</b>	Leite integral	<b>Caso</b>	0,7 (0,9)	(0-3)
		<b>Controle</b>	0,4 (0,6)	(0-2,5)
	Leite desnatado	<b>Caso</b>	0,4 (0,9)	(0-3)
		<b>Controle</b>	0,02 (0,05)	(0-0,14)
	Leite semi-desnatado	<b>Caso</b>	0,3 (0,8)	(0-2,5)
		<b>Controle</b>	0,004 (0,02)	(0-0,08)
	Iogurte natural	<b>Caso</b>	0,5 (0,9)	(0-2,5)
		<b>Controle</b>	0,3 (0,3)	(0-0,79)
	Iogurte com frutas	<b>Caso</b>	0,3 (0,8)	(0-2,5)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,2)	(0-0,79)

**Tabela 10:** Participação dos alimentos nos grupos, médias de consumo ao dia dos alimentos consumidos pela população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

(Continuação)

<b>Grupo Alimentar</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Grupo</b>	<b>Frequência diária (dp)</b>	<b>Frequência diária (amplitude)</b>	
<b>Leite e derivados</b>	Queijo mussarela, prato, parmesão e provolone	<b>Caso</b>	0,5 (0,7)	(0-2,5)	
		<b>Controle</b>	0,5 (0,6)	(0,03-2,5)	
	Queijo minas e ricota	<b>Caso</b>	0,4 (0,8)	(0-2,5)	
		<b>Controle</b>	0,4 (0,6)	(0-2,5)	
<b>Leguminosas</b>	Feijão	<b>Caso</b>	1,2 (0,9)	(0,14-2,5)	
		<b>Controle</b>	0,6 (0,5)	(0,08-2,5)	
	Lentilha, ervilha seca, grão de bico, soja	<b>Caso</b>	0,05 (0,09)	(0-0,43)	
		<b>Controle</b>	0,06 (0,1)	(0-0,43)	
	Feijão tropeiro e feijoada	<b>Caso</b>	0,03 (0,03)	(0-0,14)	
		<b>Controle</b>	0,02 (0,04)	(0-0,14)	
	<b>Cereais, raízes e tubérculos</b>	Arroz branco ou integral cozido com óleo e temperos	<b>Caso</b>	1,5 (0,9)	(0,43-2,5)
			<b>Controle</b>	1,4 (0,7)	(0,43-2,5)
Batata frita ou mandioca frita		<b>Caso</b>	0,07 (0,1)	(0-0,43)	
		<b>Controle</b>	0,2 (0,1)	(0,03-0,43)	
Batata, mandioca, inhame (cozida ou assada), purê		<b>Caso</b>	0,1 (0,12)	(0-0,43)	
		<b>Controle</b>	0,2 (0,2)	(0-0,43)	
Farinha de mandioca, farofa, cuscuz, aveia, tapioca		<b>Caso</b>	0,2 (0,3)	(0-1)	
		<b>Controle</b>	0,1 (0,2)	(0-1)	
Pão francês, pão de forma, integral, pão doce, torrada		<b>Caso</b>	0,7 (0,6)	(0,14-3)	
		<b>Controle</b>	1,7 (0,8)	(0-2,5)	
Biscoito sem recheio (doce, salgado)		<b>Caso</b>	0,4 (0,6)	(0-2,5)	
		<b>Controle</b>	0,5 (0,6)	(0-2,5)	
Biscoito recheado, waffer, amanteigado		<b>Caso</b>	0,1 (0,3)	(0-1)	
		<b>Controle</b>	0,09 (0,2)	(0-0,43)	
Bolo (simples, recheado)		<b>Caso</b>	0,1 (0,13)	(0-0,43)	
		<b>Controle</b>	0,1 (0,13)	(0-0,43)	
<b>Hortaliças</b>	Alface	<b>Caso</b>	1,2 (0,9)	(0,08-3)	
		<b>Controle</b>	0,8 (0,6)	(0,14-2,5)	
	Tomate	<b>Caso</b>	1,4 (1,07)	(0,08-3)	
		<b>Controle</b>	0,8 (0,6)	(0,03-2,5)	
	Cenoura	<b>Caso</b>	0,6 (0,7)	(0,08-2,5)	
		<b>Controle</b>	0,4 (0,2)	(0-1)	
	Outros legumes (abobrinha, berinjela, chuchu, pepino)	<b>Caso</b>	0,4 (0,3)	(0,08-1)	
		<b>Controle</b>	0,5 (0,7)	(0-2,5)	
	Outras verduras cruas (acelga, rúcula, agrião)	<b>Caso</b>	0,4 (0,3)	(0,08-1)	
		<b>Controle</b>	0,4 (0,2)	(0-1)	

**Tabela 10:** Participação dos alimentos nos grupos, médias de consumo ao dia dos alimentos consumidos pela população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

(Continuação)

<b>Grupo Alimentar</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Grupo</b>	<b>Frequência diária (dp)</b>	<b>Frequência diária (amplitude)</b>
<b>Hortaliças</b>	Outras verduras cozidas (acelga, espinafre, escarola, couve)	<b>Caso</b>	0,3 (0,2)	(0-1)
		<b>Controle</b>	0,3 (0,2)	(0-0,79)
	Brócolis, couve-flor, repolho	<b>Caso</b>	0,2 (0,15)	(0-0,43)
		<b>Controle</b>	0,3 (0,3)	(0-1)
<b>Frutas</b>	Laranja, mexerica, abacaxi	<b>Caso</b>	0,8 (0,9)	(0-3)
		<b>Controle</b>	0,4 (0,5)	(0,03-2,5)
	Banana	<b>Caso</b>	0,8 (0,9)	(0-3)
		<b>Controle</b>	0,4 (0,2)	(0,08-1)
	Maçã, pêra	<b>Caso</b>	0,5 (0,7)	(0-3)
		<b>Controle</b>	0,3 (0,3)	(0-1)
	Melão, melancia	<b>Caso</b>	0,3 (0,7)	(0-1)
		<b>Controle</b>	0,1 (0,1)	(0-0,43)
	Mamão	<b>Caso</b>	0,3 (0,3)	(0-1)
		<b>Controle</b>	0,08 (0,06)	(0-0,14)
	Goiaba	<b>Caso</b>	0,1 (0,2)	(0-1)
		<b>Controle</b>	0,008 (0,02)	(0-0,08)
	Abacate	<b>Caso</b>	0,8 (0,2)	(0-1)
		<b>Controle</b>	0,07 (0,01)	(0-0,03)
	Suco natural	<b>Caso</b>	0,7 (0,9)	(0-3)
		<b>Controle</b>	0,3 (0,2)	(0-1)
<b>Industrializados</b>	Maionese, molho para salada, patê, chantily	<b>Caso</b>	0,1 (0,16)	(0-0,43)
		<b>Controle</b>	0,1 (0,2)	(0-1)
	Condimentos	<b>Caso</b>	0,4 (0,6)	(0-2,5)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,3)	(0-0,79)
	Hamburguer, nuggets, almôndega	<b>Caso</b>	0,06 (0,09)	(0-0,43)
		<b>Controle</b>	0,05 (0,09)	(0-0,43)
	Suco industrializado	<b>Caso</b>	0,8 (1,05)	(0-3)
		<b>Controle</b>	0,5 (0,3)	(0-1)
	Refrigerante comum	<b>Caso</b>	0,2 (0,2)	(0-0,79)
		<b>Controle</b>	0,2 (0,2)	(0-0,43)
	Refrigerante light, diet	<b>Caso</b>	0	0
		<b>Controle</b>	0,07 (0,2)	(0-0,43)

**Tabela 10:** Participação dos alimentos nos grupos, médias de consumo ao dia dos alimentos consumidos pela população estudada. São Paulo, SP, 2013-2014.

(Continuação)

Grupo Alimentar	Alimentos	Grupo	Frequência diária (dp)	Frequência diária (amplitude)
Infusão	Chá e café sem açúcar	Caso	0,9 (1)	(0-2,5)
		Controle	0,6 (0,7)	(0-2,5)
	Chá e café com açúcar	Caso	0,8 (0,8)	(0-2,5)
		Controle	0,7 (0,8)	(0-3)
Bebida alcoólica	Cerveja	Caso	0,03 (0,05)	(0-0,14)
		Controle	0,074 (0,1)	(0-0,43)
Óleos e gorduras	Óleo, azeite ou vinagre para tempero de salada	Caso	1 (0,9)	(0-2,5)
		Controle	0,3 (0,3)	(0-1)
	Manteiga ou margarina comum	Caso	0,9 (0,9)	(0-2,5)
		Controle	0,7 (0,7)	(0-2,5)
	Manteiga ou margarina light	Caso	0,2 (0,6)	(0-2,5)
		Controle	0,07 (0,03)	(0-0,14)
Lanches	Salgado frito	Caso	0,2 (0,3)	(0-1)
		Controle	0,1 (0,1)	(0-0,43)
	Salgado assado	Caso	0,14 (0,2)	(0-1)
		Controle	0,2 (0,2)	(0-0,43)
	Sanduiche	Caso	0,06 (0,09)	(0-0,43)
		Controle	0,05 (0,04)	(0-0,14)
Açúcar e doces	Chocolate, bombom, brigadeiro	Caso	0,4 (0,4)	(0-1)
		Controle	0,6 (0,4)	(0,03-2)
	Achocolatado em pó (adicionado ao leite)	Caso	0,13 (0,3)	(0-1)
		Controle	0,2 (0,3)	(0-1)
	Sobremesas, doces, tortas e pudins	Caso	0,2 (0,3)	(0-1)
		Controle	0,3 (0,3)	(0,03-1)
	Açúcar, mel e geléia	Caso	0,5 (0,7)	(0-3)
		Controle	0,8 (1)	(0-3)