Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Análise da microbiota intestinal em adultos com
hábitos alimentares distintos e de associações
com a inflamação e resistência à insulina**

Ana Carolina Franco de Moraes

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Nutrição em
Saúde Pública para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública

Orientadora: Profa. Titular Sandra
Roberta G. Ferreira Vivolo

Co-orientadora: Profa. Dra. Bianca
de Almeida Pititto

São Paulo
2016

Análise da microbiota intestinal em adultos com hábitos alimentares distintos e de associações com a inflamação e resistência à insulina

Ana Carolina Franco de Moraes

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Titular Sandra Roberta G. Ferreira Vivolo

Co-orientadora: Profa. Dra. Bianca de Almeida Pititto

São Paulo

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos, por permitirem que eu conquistasse meus sonhos graças ao amor, apoio e dedicação que sempre tiveram por mim. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.

Ao meu marido, que esteve sempre comigo, nos bons e maus momentos. Agradeço por me inspirar, me ajudar e me encorajar a ser cada dia melhor. Te amo!

AGRADECIMENTOS

À profa. Sandra Roberta G. Ferreira Vivolo, minha orientadora, pela confiança, amizade, conselhos e paciência ao longo destes quatro anos de intenso aprendizado. Agradeço pela demonstração de dedicação e amor ao trabalho. E, principalmente, por ter ajudado a transformar meus sonhos em realidade.

À profa. Bianca de Almeida Pititto, minha co-orientadora, por partilhar suas experiências e tornar minha trajetória mais tranquila. Agradeço pela amizade, parceria, sugestões e ensinamentos essenciais para que eu conseguisse concluir esta fase.

À Adriana, Isis, Luciana e Milena, que partilharam comigo de todas as angústias e alegrias da pós-graduação. Sem vocês, as dificuldades teriam sido maiores.

Aos meus sobrinhos, irmão e cunhada que me ampararam, fizeram companhia e me deram muito amor ao longo do meu estágio de pesquisa no exterior. Agradeço por terem me ajudado a superar a saudade e as dificuldades.

Aos amigos e familiares que me acompanharam e apoiaram durante esta trajetória.

A todos os alunos e pesquisadores envolvidos no Estudo ADVENTO, pela coleta de dados e sugestões. Sem vocês, esta pesquisa não teria sido possível.

Aos funcionários da Secretária de Pós-graduação e do Departamento de Nutrição por todo auxílio.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio indispensável para a realização desta pesquisa.

RESUMO

MORAES, A.C.F. Análise da microbiota intestinal em adultos com hábitos alimentares distintos e de associações com a inflamação e resistência à insulina. [Tese de doutorado]. Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo; 2016.

Introdução: A microbiota intestinal possui grande diversidade de bactérias, predominantemente dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, com múltiplas funções. A alimentação pode alterar sua composição e função. Alto teor de gordura saturada altera a permeabilidade intestinal, eleva os lipopolissacarídeos e predispõe à inflamação subclínica crônica. Dieta rica em fibras, como a vegetariana, induz elevação de ácidos graxos de cadeia curta e benefícios metabólicos.

Objetivos: Para analisar a composição da microbiota intestinal de adventistas com diferentes hábitos alimentares e associá-los à inflamação subclínica e resistência à insulina, esta tese incluiu: **1)** revisão dos mecanismos que associam a alimentação à microbiota intestinal e ao risco cardiometabólico; **2)** verificação da composição da microbiota intestinal segundo diferentes hábitos alimentares e de associações com biomarcadores de doenças cardiometabólicas; **3)** avaliação da associação entre a abundância de *Akkermansia muciniphila* e o metabolismo da glicose; **4)** análise da presença de enterótipos e de associações com características clínicas.

Métodos: Este estudo transversal incluiu 295 adventistas estratificados segundo hábitos alimentares (vegetariano estrito, ovo-lacto-vegetariano e onívoro). Foram avaliadas associações com dados clínicos, bioquímicos e inflamatórios. O perfil da microbiota foi obtido por sequenciamento do gene 16S rRNA (Illumina® Miseq).

Resultados: **1)** Há evidências de que as relações entre dieta, inflamação, resistência à insulina e risco cardiometabólico são em parte mediadas pela composição da microbiota intestinal. **2)** Vegetarianos apresentaram melhor perfil clínico quando comparados aos onívoros. Confirmou-se maior abundância de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que não diferiram segundo a adiposidade corporal. Entretanto, vegetarianos estritos apresentaram mais *Bacteroidetes*, menos *Firmicutes* e maior abundância do gênero *Prevotella* quando comparados aos outros dois grupos de hábitos alimentares. Entre os ovo-lacto-vegetarianos verificou-se maior proporção de *Firmicutes* especialmente do gênero *Faecalibacterium*. Nos onívoros, houve super-representação do filo *Proteobacteria* (*Succinivibrio* e *Halomonas*) comparados aos vegetarianos. **3)** Indivíduos normoglicêmicos apresentaram maior abundância de *Akkermansia muciniphila* que aqueles com glicemia alterada. A abundância desta bactéria correlacionou-se inversamente à glicemia e hemoglobina glicosilada. **4)** Foram identificados três enterótipos (*Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcaceae*), similares àqueles previamente descritos. As concentrações de LDL-C foram menores no enterótipo 2, no qual houve maior frequência de vegetarianos estritos.

Discussão: **1)** Conhecimentos sobre participação da microbiota na fisiopatologia de doenças poderão reverter em estratégias para manipulá-la para promover saúde. **2)** Apoia-se a hipótese de que hábitos alimentares se associam favorável ou desfavoravelmente a características metabólicas e inflamatórias do hospedeiro via alterações na composição da microbiota intestinal. Sugerimos que a exposição a alimentos de origem animal possa impactar negativamente nas proporções de comunidades bacterianas. **3)** Sugerimos que a abundância da *Akkermansia muciniphila* possa participar do metabolismo da glicose. **4)** Reforçamos que a existência de três enterótipos não deva ser específica de certas populações/continentes. Apesar de desconhecido o significado biológico destes agrupamentos, as correlações com o perfil lipídico podem sugerir sua utilidade na avaliação do risco cardiometabólico.

Conclusões: Nossos achados fortalecem a ideia de que a composição da microbiota intestinal se altera mediante diferentes hábitos alimentares, que, por sua vez, estão associados a alterações nos perfis metabólicos e inflamatórios. Estudos prospectivos deverão investigar o potencial da dieta na prevenção de distúrbios cardiometabólicos mediados pela microbiota.

Palavras-chave: microbiota, hábitos alimentares, adiposidade, inflamação, resistência à insulina.

ABSTRACT

MORAES, A.C.F. Gut microbiota analysis of adults with distinct dietary habits and associations with inflammation and insulin resistance. [Doctoral thesis]. School of Public Health, USP, São Paulo; 2016.

Introduction: The gut microbiota has great bacterial diversity, predominantly of the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, with multiple functions. Diet can alter their composition and function. High amount of saturated fat alters intestinal permeability, raises the lipopolysaccharides and predisposes to low-grade inflammation. High-fiber diet, such as the vegetarian, induces the elevation of short-chain fatty acids and metabolic benefits. **Objectives:** To analyze the composition of gut microbiota of Adventists with diverse dietary patterns and associate them to the low grade inflammation and insulin resistance this thesis included: **1)** review of underlying mechanisms of the association of diet, gut microbiota composition and cardiometabolic risk; **2)** analysis of the gut microbiota composition according to different dietary patterns and associations with biomarkers of cardiometabolic diseases; **3)** evaluation of the association between the *Akkermansia muciniphila* abundance and glucose metabolism; **4)** analysis of the presence of enterotypes and associations with clinical characteristics. **Methods:** This cross-sectional study included 295 Adventists stratified according to dietary patterns (strict vegetarian, lacto-ovo-vegetarian and omnivore). Their associations with clinical, biochemical and inflammatory data were evaluated. The microbiota profile was obtained by sequencing 16S rRNA genes (Illumina® Miseq). **Results:** **1)** There are evidences that the relationship among diet, inflammation, insulin resistance and cardiometabolic risk are partly mediated by the gut microbiota. **2)** Vegetarians showed better clinical profile when compared to omnivores. It was confirmed greater abundance of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, which did not differ according to adiposity. However, strict vegetarians had more *Bacteroidetes*, fewer *Firmicutes* and higher abundance of genus *Prevotella* when compared to the other two groups of dietary patterns. The lacto-ovo-vegetarians had higher proportion of *Firmicutes* especially the genus *Faecalibacterium*. In the omnivores, there was overrepresentation of the *Gammaproteobacteria* (*Succinivibrio* and *Halomonas*) compared to vegetarians. **3)** Normoglycemic individuals had higher abundance of *Akkermansia muciniphila* compared to those with abnormal glycemic profile. The abundance of this bacterium was inversely correlated to fasting glucose and glycated hemoglobin. **4)** Three enterotypes were identified (*Bacteroides*, *Prevotella* and *Ruminococcaceae*), similar to those previously described. LDL-C concentrations were lower in enterotype 2, in which a higher frequency of strict vegetarians was found. **Discussion:** **1)** Knowledge on the involvement of the microbiota in the pathophysiology of diseases could reverse on strategies to manipulate it to promote health. **2)** Our data support the hypothesis that dietary patterns could be favorably or unfavorably associated with metabolic and inflammatory processes, via changes in the gut microbiota composition. We suggest that exposure to animal food could negatively impact on the proportions of bacterial communities. **3)** We also suggest that the abundance of *Akkermansia muciniphila* can participate in the glucose metabolism. **4)** We reinforce that the existence of three enterotypes should not be specific to certain populations/continents. Although the biological significance of these clusters remains unknown, the correlations with lipid profile may suggest their usefulness in the assessment of the cardiometabolic risk. **Conclusions:** Our findings reinforce the idea that the gut microbiota composition is altered by different dietary patterns, which, in turn, are associated with changes in metabolic and inflammatory profiles. Prospective studies should investigate the potential of diet to prevent microbiota-mediated cardiometabolic disorders.

Key-words: microbiota, dietary patterns, adiposity, inflammation, insulin resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	MICROBIOTA INTESTINAL NA FISIOPATOGENESE DE DOENÇAS RELACIONADAS AO METABOLISMO ENERGÉTICO.....	12
	• <i>Fasting-Induced Adipose Factor</i> – FIAF	14
	• Monofosfato-Adenosina Proteína Quinase (AMP-Q)	15
	• Eixo intestino-cerebral	15
	• Lipopolissacarídeos (LPS).....	16
1.2	POTENCIAL DA ALIMENTAÇÃO COMO MODULADORA DA MICROBIOTA.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	HIPÓTESES.....	22
4	OBJETIVOS.....	23
4.1	GERAL	23
4.2	ESPECÍFICOS	23
5	MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1	AMOSTRA.....	24
5.2	VARIÁVEIS CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS	27
5.3	MICROBIOTA INTESTINAL	28
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5.5	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
6	ARTIGOS.....	31
6.1	ARTIGO 1 – Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética	32
6.2	ARTIGO 2 – Diverse gut bacteria could be linked with distinct dietary patterns, inflammatory status and insulin resistance	43
6.3	ARTIGO 3 - Akkermansia muciniphila mediates effects of IFN γ on glucose metabolism	66

6.4	ARTIGO 4 – Presence of the gut enterotypes in an admixed population and correlations to lipid parameters	68
6.5	RESULTADOS E COMENTÁRIOS ADICIONAIS	85
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	92
8	REFERÊNCIAS.....	92
	ANEXOS.....	104
	Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido	104
	Anexo B – Parecer consubstanciado CEP/FSP/USP	107
	Anexo C – Parecer consubstanciado CEP/HU/USP.....	110
	CURRÍCULO LATTES.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

ADVENTO, Análise de Dieta e Hábitos de Vida na Prevenção de Eventos Cardiovasculares em Adventistas do Sétimo Dia

AGCC, ácidos graxos de cadeia curta

AHS, *Adventist Health Study*

AMP-Q, monofosfato-adenosina proteína quinase

DCNT, doenças crônicas não transmissíveis

DM2, diabetes mellitus tipo 2

DNA, *deoxyribonucleic acid*

FFAR, receptores de ácidos graxos livres

FIAF, *fasting induced adipose fator*

GPCR, receptores acoplados à proteína G

HDL, lipoproteína de alta densidade

HU, Hospital Universitário

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ , interferon gamma

IL, interleucina

IMC, índice de massa corporal

INCOR, Instituto do Coração da Universidade de São Paulo

LDL, lipoproteína de baixa densidade

LPL, lipase de lipoproteína

LPS, lipopolissacarídeos

MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*

NF- κ B, *factor nuclear kappa B*

OTUs, *operational taxonomic units*

PCR, proteína C-reativa

PYY, peptídeo YY

RNA, *ribonucleic acid*

TLR, receptores *toll-like*

TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*

VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade

WHO, *World Health Organization*

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal humano, especialmente o cólon, é densamente povoado por bactérias, fungos, *archaea* e vírus. A este ecossistema, dá-se o nome de microbiota intestinal, que se estima conter 100 trilhões de microrganismos, número dez vezes maior que a quantidade de células humanas (QIN et al., 2010; SHEN et al., 2013, LOPEZ-LEGARREA et al., 2014). A microbiota de cada indivíduo é única, parte geneticamente definida, mas também por outros fatores como tipo de parto, amamentação, idade, uso de antibióticos e dieta (MARIAT et al., 2009; LE HUËROU-LURON et al., 2010; SPOR et al., 2011; LANG et al., 2014; RAYMOND et al., 2015).

Há evidências da presença de bactérias já no ambiente intrauterino (MATAMOROS et al., 2013). Após o nascimento, o intestino passa a ser colonizado por bactérias com papel fundamental para a manutenção da saúde, estando envolvidas não apenas na digestão de alimentos, regulação energética, síntese de vitaminas e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), mas também na proteção contra patógenos e na modulação do sistema imune (MARIAT et al., 2009; KAPLAN e WALKER, 2012; AZIZ et al., 2013).

Os avanços em relação às técnicas utilizadas para o sequenciamento do DNA bacteriano permitiram grande melhoria na identificação das comunidades bacterianas (TILG e KASER, 2011; WALSH et al., 2014), que pode ser realizada nos diferentes níveis taxonômicos (LOZUPONE et al., 2012; SHANAHAN, 2013). Filos representam o nível mais alto desta classificação que são subdivididos em classe, ordem, família, gênero e espécie. A exata composição da microbiota permanece desconhecida, porém há consenso de que na maioria dos indivíduos cerca de 90%

das bactérias pertencem aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, sendo o restante composto principalmente por *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*. Entre os principais integrantes dos *Firmicutes* estão os gêneros *Lactobacillus*, *Faecalibacterium* e *Enterococcus* e entre os *Bacteroidetes* estão os *Bacteroides* e *Prevotella* (WU et al., 2010; PERIS-BONDIA et al., 2011; ANGELAKIS et al., 2012; HARRIS et al., 2012).

Recentemente, alguns autores sugeriram classificar a microbiota intestinal em agrupamentos comuns de gêneros de bactérias, chamados enterótipos (ARUMUGAM et al., 2011). Ao avaliar indivíduos pertencentes a seis diferentes nacionalidades, encontraram três enterótipos: *Bacteroides* (enterótipo 1), *Prevotella* (enterótipo 2) e *Ruminococcus* (enterótipo 3) e concluíram que estes agrupamentos ocorrem independentes da nacionalidade, índice de massa corporal (IMC), idade ou sexo (ARUMUGAM et al., 2011). Entretanto, não há consenso sobre a distribuição destes enterótipos em diferentes populações (WU et al., 2011; LIM et al., 2014; ROAGER et al., 2014).

Em paralelo, surgem evidências de que a composição deste ecossistema poderia influenciar o metabolismo do hospedeiro, especialmente no que concerne à ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), com elevadas prevalências nas populações atuais (LEY et al., 2005; KOETH et al., 2013). Sendo assim, entre os desafios atuais na área da Nutrição está o de se elucidar como hábitos alimentares e/ou suplementos poderiam contribuir para a modulação de microbiota intestinal associada à saúde (SHEN et al., 2013).

Entre as DCNTs, é reconhecido que as doenças cardiometabólicas relacionadas à obesidade compartilham fatores ambientais na sua etiopatogenia,

bem como mecanismos fisiopatológicos, dentre estes a inflamação crônica subclínica e a resistência à insulina. Esta condição pode ser detectada por meio da determinação sanguínea de biomarcadores. O tecido adiposo hipertrofiado produz *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1); macrófagos infiltrados entre os adipócitos potencializam a produção de outras citocinas inflamatórias, tais como interleucinas e o *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), que deterioram a sensibilidade à insulina. As concentrações circulantes de diversas citocinas têm sido empregadas como marcadores de inflamação em DCNTs (CALDER et al., 2013).

1.1 MICROBIOTA INTESTINAL NA FISIOPATOGENESE DE DOENÇAS RELACIONADAS AO METABOLISMO ENERGÉTICO

A prevalência de obesidade tem crescido substancialmente nas últimas décadas, sendo alarmantes os problemas de saúde decorrentes da adiposidade excessiva (SHEN et al., 2013; KAPLAN e WALKER, 2012). As causas da obesidade são múltiplas, envolvendo fatores genéticos, hábitos de vida e fatores biológicos diversos. Nos países em desenvolvimento, os padrões de consumo alimentar sofreram intensas e rápidas modificações, principalmente em relação ao maior consumo de gordura saturada, sódio e carboidratos simples, que, associados à inatividade física, têm acarretado ganho de peso. Segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (IBGE, 2010), em 35 anos o excesso de peso quase triplicou entre homens, passando de 18,5% para 50,1%, e nas mulheres saltou de 28,7% para 48%. Já a obesidade (IMC >30 kg/m²) cresceu mais de quatro vezes entre os homens (2,8% para 12,4%) e mais de duas vezes entre as mulheres (8,0% para 16,9%).

Pesquisas recentes sugerem que as bactérias que colonizam o intestino humano possam desempenhar papel de destaque na gênese da obesidade e de outras DCNTs, como o diabetes tipo 2 (DM2) e a aterosclerose (LARSEN et al., 2010; KOETH et al., 2013). No entanto, ainda são conflitantes os achados relacionados à composição da microbiota no excesso de peso, especialmente quanto à proporção dos dois maiores filos. Alguns pesquisadores encontraram que a obesidade estava associada a maior abundância relativa de *Firmicutes* em relação aos *Bacteroidetes* (LEY et al., 2005), porém outros não obtiveram os mesmos resultados (DUNCAN et al., 2008; FINUCANE et al., 2014). Uma metanálise não confirmou a menor proporção de *Bacteroidetes* em indivíduos com peso excessivo (ANGELAKIS et al., 2012), sugerindo que diferenças na microbiota intestinal segundo o estado nutricional podem não ser universalmente verdadeiras. Sendo assim, ainda existem lacunas no conhecimento sobre estas inter-relações e que implicações esta compreensão poderá trazer para o controle da obesidade. Se alterações da composição da microbiota são fatores causais de obesidade ou se são resultado dela tem sido motivo de grande interesse na literatura (TEHRANI et al., 2012; SHEN et al., 2013).

Considerando que a adiposidade corporal excessiva pode ocorrer em resposta a uma alimentação rica em gorduras – especialmente saturadas – que estimula a expressão e produção anormal de mediadores que comprometem a sensibilidade à insulina (LARSEN et al., 2010; TEHRANI, 2012), diversos autores buscaram aprofundar o conhecimento sobre a possível participação da microbiota intestinal nos processos fisiopatológicos das DCNTs frente a estímulos alimentares.

Estes conhecimentos originam-se principalmente de modelos animais (TSUKUMO et al., 2009; CARICILLI et al., 2011; CARVALHO et al., 2012).

Estudos envolvendo transplante da microbiota de roedores magros e obesos para animais *germ-free* verificaram que em poucas semanas houve ganho de gordura e maior extração de calorias provenientes da ração nos animais que receberam a microbiota de doadores obesos, comparados àqueles que receberam a microbiota de doadores magros, mesmo sem acréscimo no consumo de ração. Estes dados sugerem que as características da microbiota dos animais obesos *per se* contribuem para o acúmulo de gordura e ganho de peso (LEY et al., 2005; HARRIS et al., 2012; TEHRANI et al., 2012). A partir destes resultados, mecanismos e mediadores foram propostos para explicar como a composição da microbiota poderia influenciar a gênese de doenças relacionadas ao metabolismo energético que elevam o risco cardiovascular, descritos a seguir.

- *Fasting-Induced Adipose Factor* – FIAF

O FIAF é um inibidor da lipase de lipoproteína (LPL), produzido pelo intestino, fígado e tecido adiposo. Quando suprimido pela ação da microbiota intestinal há aumento da atividade da LPL que determina a maior absorção de ácidos graxos e acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos. Verificou-se que animais deficientes de FIAF, quando alimentados com dieta ocidental, ganharam mais peso corporal que animais FIAF+/+ *wild-type* (BÄCKHED et al., 2007). Coerente com sua maior adiposidade, os deficientes de FIAF também apresentaram maiores concentrações de leptina e insulina. Apesar de indícios de que possa favorecer o aumento da adiposidade corporal, a real contribuição do FIAF intestinal e sua

regulação por meio de interações com populações bacterianas requerem mais investigações.

- Monofosfato-Adenosina Proteína Quinase (AMP-Q)

Outro mecanismo de regulação metabólica que é influenciado pela microbiota envolve a AMP-Q. Esta enzima participa na regulação do metabolismo de ácidos graxos e glicose em diferentes tecidos. Quando esta via da AMP-Q é inibida, ativa processos anabólicos e bloqueia catabólicos, predispondo ao ganho de peso. Observou-se que camundongos *germ-free*, mesmo com uma dieta hipercalórica, mantiveram peso, fato atribuído à elevação da atividade da AMP-Q no fígado e músculo esquelético e à maior oxidação de ácidos graxos, melhorando a sensibilidade à insulina (BÄCKHED et al., 2007; KOLA, 2008). Tais achados sugerem que a presença da microbiota suprime a oxidação de ácidos graxos no músculo por mecanismo que envolve a inibição da AMP-Q, determinando aumento de adiposidade e geração de resistência à insulina.

- Eixo intestino-cerebral

A microbiota intestinal é capaz de influenciar não apenas o trato gastrointestinal, mas também o comportamento alimentar por efeitos na regulação central do apetite e saciedade (MUCCIOLI et al., 2010). Fibras alimentares são fermentadas especialmente pelos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* e *Lactobacillus*. Essa ação microbiana resulta na produção de AGCC, principalmente acetato, propionato e butirato (WONG et al., 2006; ROBERFROID et al., 2010), que induzem a expressão de genes que codificam para proteínas de junção celular (occludinas e *zonula occludens-1*),

necessárias para função barreira da mucosa intestinal. O aumento da produção de AGCC resulta em diminuição do pH intestinal, que pode indiretamente influenciar na composição da microbiota (WONG et al., 2006).

Além de serem fonte de energia, os AGCC possuem a capacidade de se ligar a receptores acoplados à proteína G (GPCR), também denominados receptores de ácidos graxos livres (FFAR). Estes são expressos em células enteroendócrinas L e, ao serem ativados, aumentam a produção de peptídeo YY (PYY) no período pós-prandial, reduzindo a motilidade intestinal e propiciando maior absorção de nutrientes, em especial dos AGCC (LISZT et al., 2009; CANANI et al., 2011). Além disso, o PYY, no nível central, atua inibindo neurônios orexígenos do núcleo arqueado, induzindo saciedade (TAZOE et al., 2008, HOLZER et al., 2012; ULVEN, 2012).

O sistema endocanabinóide está envolvido na regulação da motilidade intestinal, metabolismo energético, apetite e na modulação da resposta inflamatória. A interação entre peptídeos estimulados pela microbiota intestinal e o sistema endocanabinóide interferem na permeabilidade intestinal que pode resultar em endotoxemia metabólica, presente na obesidade e comorbidades (MUCIOLLI et al., 2010; EVERARD et al., 2013).

- Lipopolissacarídeos (LPS)

A microbiota intestinal representa um grande reservatório de LPS, principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas. A circulação sérica de LPS inicia a ativação dos receptores *Toll-like* (TLR) do sistema imune inato, especialmente o TLR4. Quando ativados, estes receptores induzem reações intracelulares, principalmente via fator de transcrição NF- κ B e culminam com a

produção de mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α e a interleucina 6 (IL-6) que comprometem a sinalização insulínica, induzindo resistência à insulina (CANI et al., 2007; KIM et al., 2012; CARICILLI e SAAD, 2013). O aumento das concentrações circulantes de LPS denomina-se endotoxemia metabólica (CANI et al., 2007; CARICILLI e SAAD, 2013).

Evidências apontam que a exposição crônica à gordura saturada pode estimular a proliferação destas bactérias. Consumidores de alto teor de gordura saturada teriam a permeabilidade intestinal alterada e ativação de mastócitos da mucosa intestinal (JI et al., 2011; LEE, 2013). Dessa forma, a dieta hiperlipídica poderia favorecer doenças cardiometabólicas por intermédio de modificações na composição da microbiota intestinal.

Por outro lado, dietas ricas em fibras poderiam contribuir para atenuar a endotoxemia metabólica por favorecerem a proliferação de bactérias gram-negativas anaeróbicas produtoras de ÁCC. É sabido, por exemplo, que *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia inulinivorans* produzem butirato, que, por induzir a produção de proteínas de junção celular, preserva a barreira intestinal e diminui a translocação de LPS. Além disso, descreve-se ação anti-inflamatória via inibição do NF- κ B em colonócitos (LISZT et al., 2009; CANANI et al., 2011; MIQUEL et al., 2013).

1.2 POTENCIAL DA ALIMENTAÇÃO COMO MODULADORA DA MICROBIOTA

É reconhecido que hábitos alimentares se associam a perfis de risco cardiometabólico distintos e acumulam-se evidências de que composição da

microbiota exerce papel relevante na interação dieta e risco de doenças (DE FILIPPO et al., 2010; KIM et al., 2013; KOETH et al., 2013).

A composição e a diversidade da microbiota são consideradas importantes para determinar a simbiose entre hospedeiro e bactérias. Certos padrões dietéticos têm potencial para otimizar esta simbiose (WU et al., 2011). Pesquisadores sugerem que a qualidade da dieta é responsável por 57% da variação da composição da microbiota, enquanto apenas 12% estariam relacionados a fatores genéticos (ZHANG et al., 2010). Enquanto uma dieta mais saudável – rica em vegetais, frutas, fibras e gorduras insaturadas – tem sido considerada cardioprotetora (PETTERSEN et al., 2012; ORLICH et al., 2013; SABATÉ e WIEN, 2015), o padrão tipicamente ocidental associa-se a distúrbios do metabolismo glicídico e lipídico, em grande parte mediados por um estado de inflamação subclínica crônica (GIUGLIANO et al., 2006; CALDER et al., 2013). Mais recentemente, reconheceu-se que a microbiota responde rapidamente a mudanças de macronutrientes na dieta. Em poucos dias de dieta baseada em produtos animais ou vegetais, verificam-se alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo (DAVID et al., 2014).

Nutrientes e fibras alimentares consumidos pelo hospedeiro são assimilados pelas bactérias intestinais e convertidos a outros metabólitos, capazes de induzir alterações na composição da microbiota. Também os prebióticos – definidos como ingrediente alimentar não digerível fermentável – podem induzir a proliferação de bactérias benéficas, principalmente *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013). Estudos experimentais indicaram que a suplementação com prebióticos, buscando aumentar seletivamente as *Bifidobacterium*, foi capaz de melhorar a tolerância à glicose e normalizar o processo inflamatório subclínico com

redução das concentrações de LPS (CANI et al., 2008; DELZENNE e CANI, 2010; LARSEN et al., 2010; CANI e DELZENNE, 2011). Além disso, Cani et al. (2008), ao estudarem a relação entre microbiota, integridade epitelial e obesidade, confirmaram que prebióticos eram capazes de reduzir a permeabilidade intestinal, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a resistência à insulina de ratos obesos submetidos à dieta hiperlipídica.

Investigações acerca da modulação da microbiota pela dieta rica em carboidratos, especialmente fibras, no longo prazo, observaram aumento da abundância do gênero *Prevotella*, pertencente ao filo *Bacteroidetes* (FERROCINO et al., 2015; RUENGSONGWONG et al., 2014). Comparando-se a microbiota intestinal de crianças italianas em dieta ocidental com a de crianças africanas residentes na zona rural, consumindo dieta praticamente vegetariana, observou-se que as últimas apresentaram menos bactérias da família *Enterobacteriaceae* (*Shigella* e *Escherichia coli*), maior proporção de *Bacteroidetes* e menor de *Firmicutes* (DE FILIPPO et al., 2010). Estudo que buscou associar enterótipos à dieta, confirmou relação entre o enterótipo 2 (*Prevotella*) e dietas ricas em fibras, naqueles que se autodenominaram vegetarianos. Em contraste, a dieta ocidental, rica em proteína e gordura saturada, associou-se ao enterótipo *Bacteroides* (WU et al., 2011). Posteriormente, em experimento de curto prazo, testando a estabilidade da microbiota frente à dieta hiperlipídica pobre em fibras, ou à hipolipídica e rica em fibras, os autores concluíram que intervenções podem rapidamente alterar a composição da microbiota, mas não a alteração do enterótipo, indicando que semanas são insuficientes para produzir alterações duradouras da sua composição (WU et al., 2011).

Apesar de estudos clínicos terem descrito benefícios da suplementação com bactérias vivas (probióticos), ainda não se sabe se poderiam impactar na população bacteriana intestinal autóctone, já que esta se auto-regula, dificultando o estabelecimento de uma bactéria alóctone (SAAD, 2006). Alguns ensaios clínicos com suplementação de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, destinados ao controle de distúrbios cardiometabólicos, foram conduzidos e seus resultados são não uniformes (BARZ et al., 2015). Existe expectativa de que uma bactéria em particular, a *Akkermansia muciniphila* que degrada mucina, possa ter efeito probiótico. Demonstrou-se, em animais de experimentação, que esta bactéria melhorou a permeabilidade intestinal por aumentar a espessura da camada de muco da mucosa intestinal, reduzindo a endotoxemia metabólica (EVERARD et al., 2013).

Outra abordagem sobre o impacto de padrões alimentares na microbiota poderia ser através da classificação dos indivíduos em vegetarianos estritos, ovo-lacto-vegetarianos e onívoros. O interesse decorre das evidências de que dietas vegetarianas têm sido associadas a um melhor perfil de risco cardiometabólico que a dieta tipicamente ocidental (TEIXEIRA et al., 2007; PETTERSEN et al., 2012; SILVA et al., 2012; TONSTAD et al., 2013). Uma oportunidade de aprofundar esta linha de investigação são os estudos envolvendo os membros da Igreja Adventista do Sétimo Dia, que representam o sexto maior movimento religioso internacional (SEVENTH-DAY ADVENTIST CHURCH, 2011). Estima-se que na divisão Sul-Americana existam mais de 2 milhões de membros, sendo a maioria brasileiros (<http://www.adventistas.org/pt/institucional/os-adventistas/adventistas-no-mundo/>).

O estudo de coorte dos adventistas do sétimo dia (*Adventist Health Study – AHS*), conduzido por pesquisadores da Universidade de Loma Linda (Califórnia,

EUA) representa marco importante no conhecimento das diferenças no perfil de morbidade e mortalidade entre indivíduos que consomem ou não carne. Considerando que os adeptos desta religião habitualmente são vegetarianos, os dados obtidos no AHS têm trazido importantes contribuições para o entendimento da relação entre dietas específicas com DCNTs e mortalidade. Os adventistas vegetarianos são, em geral, mais magros e vivem mais que os não-vegetarianos (RIZZO et al., 2011; ORLICH et al., 2013; TONSTAD et al., 2013). Entretanto, deve-se ressaltar que, frequentemente, estes indivíduos apresentam outros hábitos de vida saudáveis (prática de atividade física e a abstenção de bebidas alcoólicas e do fumo) que devem estar contribuindo para este quadro.

A adesão às práticas alimentares entre os adventistas é variável. Resultados do AHS indicam que cerca de metade dos indivíduos estudados apresentavam dieta onívora, similar à da população americana em geral, enquanto apenas 4,2% eram vegetarianos estritos e 31,6% ovo-lacto-vegetarianos (BUTLER et al., 2008). Em estudo brasileiro, foi identificado que apenas 6,1% dos adventistas eram vegetarianos estritos e 13,3% ovo-lacto-vegetarianos (SILVA et al., 2012).

Há, ainda, muitas dúvidas a respeito de quais hábitos alimentares, por quanto tempo e por quais mecanismos modulariam a microbiota intestinal. É provável que modificações nos hábitos alimentares possam provocar uma composição mais saudável, bem como é possível que suplementações terapêuticas da dieta a influenciem positivamente, visando à prevenção de distúrbios metabólicos que afetam o homem moderno.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que o consumo de gorduras saturadas, típicas da dieta ocidental, induz inflamação, resistência à insulina e predispõe a DCNTs e que a microbiota intestinal pode ser modulada pela composição da dieta, justificam-se investigações sobre como a colonização bacteriana pode variar segundo a dieta, afetando a adiposidade corporal e o risco cardiometabólico. A investigação da relação entre hábitos alimentares, bactérias intestinais e estado inflamatório pode fornecer subsídios para o planejamento de intervenções voltados à prevenção e controle de DCNTs interligadas pela resistência à insulina.

Foi oportuna a chance de se estudar o impacto de diferentes hábitos alimentares sobre a composição da microbiota nos membros da Igreja Adventista do Sétimo Dia no Brasil. Iniciativas para avaliar o impacto de seus costumes em fatores de risco cardiometabólico eram escassas em nosso meio (BUTLER et al., 2008; SILVA et al., 2012). O Estudo ADVENTO (FAPESP n° 2012/03880-9), envolvendo os adventistas moradores do Estado de São Paulo, ainda em andamento, representou uma oportunidade única para tanto. Até onde conhecemos, não há publicações no Brasil a respeito das características da microbiota de subgrupos de adventistas estratificados segundo seus hábitos alimentares.

3 HIPÓTESES

- Há diferenças quanto à composição da microbiota intestinal de indivíduos segundo seus hábitos alimentares;

- Enterótipos previamente descritos em outras populações estão presentes na brasileira e associam-se a hábitos alimentares;
- Há associação de comunidades bacterianas intestinais com a adiposidade corporal, estado inflamatório subclínico e resistência à insulina;
- Dietas vegetarianas comparadas à onívora associam-se à microbiota com menor potencial inflamatório e ao perfil metabólico mais favorável.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Analisar a composição da microbiota intestinal de indivíduos adventistas com diferentes hábitos alimentares (vegetarianos estritos, ovo-lacto-vegetarianos e onívoros) e associá-lo a marcadores de inflamação subclínica e de resistência à insulina.

4.2 ESPECÍFICOS

- Revisar os mecanismos que associam a alimentação à microbiota intestinal e ao risco cardiometabólico;
- Descrever a composição da microbiota intestinal segundo os diferentes hábitos alimentares (vegetarianos estritos, ovo-lacto-vegetarianos e onívoros) e testar associações com biomarcadores de doenças cardiometabólicas;
- Examinar a existência de enterótipos previamente descritos em indivíduos brasileiros e associações com características clínicas;

- Examinar comparativamente a composição da microbiota intestinal de indivíduos estratificados pelo estado de tolerância à glicose.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA

Uma amostra de conveniência, selecionada a partir do Estudo ADVENTO – Análise de Dieta e Hábitos de Vida na Prevenção de Eventos Cardiovasculares em Adventistas do Sétimo Dia (<http://www.estudoadvento.org>) foi convidada a participar deste estudo transversal. O estudo matriz pretende incluir 1.500 membros ativos na Igreja Adventista do Sétimo Dia do Estado de São Paulo até o início de 2016. Líderes religiosos que integraram o corpo de pesquisadores facilitaram o contato com a comunidade adventista. Os convites para integrar a presente amostra seguiram a ordem de agendamento dos indivíduos incluídos no Estudo ADVENTO. Assim como o estudo matriz, o presente estudo foi conduzido no Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo. A coleta de dados foi iniciada em março de 2013 e encerrada em outubro de 2014.

Os primeiros 438 participantes (Figura 1), com idade entre 35 e 65 anos, foram avaliados segundo os critérios de elegibilidade e 300 foram considerados aptos para participação neste estudo. Os critérios de exclusão foram diabetes mellitus, IMC maior ou igual a 40 kg/m², história de doença inflamatória intestinal ou diarreia persistente (por mais de duas semanas) e uso de antibióticos ou suplementos de prebióticos ou probióticos nos dois meses que antecederam a coleta.

Figura 1. Fluxograma dos participantes do estudo Advento incluídos na sub amostra do presente estudo. **DM:** diabetes mellitus; **DII:** doença inflamatória intestinal; **PCR:** proteína C-reativa; **VEG:** vegetariano estrito; **OVO:** ovo-lacto-vegetariano; **ONI:** onívoro.

Após jejum noturno, os indivíduos compareceram ao Centro de Pesquisas do HU para iniciar sua participação no estudo. Eram entregues amostra de urina de 12 horas e de fezes, seguido por coleta de sangue, avaliação antropométrica e coleta de dados clínicos. Posteriormente, passaram por entrevista sendo coletados dados sócio demográficos, questionários de saúde, medicações e frequência alimentar.

Durante o rastreamento, os indivíduos foram questionados sobre seus hábitos alimentares no último ano, de modo a direcioná-los para integrar um de três grupos de análise (vegetarianos estritos, ovo-lacto-vegetarianos ou onívoros). No entanto, após a aplicação do questionário de frequência alimentar foram reorganizados segundo os seguintes critérios: aqueles que não consumiram produtos de origem animal (carnes, ovos, leite e derivados) foram considerados vegetarianos estritos; aqueles que consumiram produtos lácteos e ovos mais que uma vez por mês foram classificados como ovo-lacto-vegetarianos e aqueles que relataram consumir quaisquer produtos de origem animal, mais do que uma vez por mês foram considerados onívoros (TONSTAD et al., 2013).

Levantamento previamente realizado pelo Estudo ADVENTO estimou que entre seus participantes existissem cerca de 700 indivíduos onívoros, 500 ovo-lacto-vegetarianos e 300 vegetarianos estritos. A partir deste dado, buscou-se por conveniência (recursos financeiros disponíveis) selecionar 100 indivíduos de cada grupo; entretanto, devido à dificuldade em encontrar este número de vegetarianos estritos, optou-se por encerrar a pesquisa com menor número de indivíduos neste grupo. Deve-se ressaltar que cinco participantes foram excluídos posteriormente por problemas nas análises bioquímicas e/ou da microbiota intestinal.

Apesar de diabetes mellitus ter sido critério de não inclusão, alguns participantes diabéticos foram inadvertidamente incluídos. Em uma amostra à parte, dados dos 27 indivíduos diabéticos foram adicionalmente analisados quanto ao perfil da microbiota. Destes, três eram vegetarianos estritos, oito ovo-lacto-vegetarianos e 16 onívoros. Assim, ao final da coleta, foram avaliados 66 vegetarianos estritos, 102 ovo-lacto-vegetarianos e 100 onívoros não diabéticos.

5.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS

A pressão arterial foi aferida após cinco minutos de repouso na posição sentada, com o braço direito apoiado na altura do átrio esquerdo. Foi utilizado o aparelho automático (Omron model HEM-712C, Omron Health Care, Inc, USA). Os valores considerados para pressão sistólica e diastólica foram aqueles que representaram a média aritmética das duas últimas medidas. A estatura (estadiômetro fixo) e peso (balança digital com capacidade de 150 kg e precisão de 100 g) foram obtidos para cálculo do IMC, dividindo-se o peso (kg) pelo quadrado de altura (m); a classificação do estado nutricional dos indivíduos foi realizada segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003). A composição corporal foi medida usando a bioimpedância tetrapolar (InBody 230; BioSpace, Seoul, Korea).

Parte das análises sanguíneas utilizadas no presente estudo foi contemplada no projeto matriz, tais como glicose, insulina, proteína C-reativa (PCR), colesterol total e as frações LDL, VLDL e HDL, triglicérides. Para tanto, as amostras coletadas foram imediatamente centrifugadas e analisadas. Teste de sobrecarga à glicose com 75 gramas foi administrado aos participantes que negaram diabetes. A glicemia foi

medida pelo método da hexoquinase enzimático (ADVIA 1200 Siemens®, Deerfield, IL, USA). As concentrações de insulina foram determinadas por ensaio imunoenzimático com pérolas (Centaur Siemmens®, Deerfield, IL, USA). O colesterol total foi medido usando o método do colesterol oxidase (enzimático colorimétrico) e a lipoproteína de alta densidade (HDL-col) também pelo método colorimétrico homogêneo sem precipitação (ADVIA 1200 Siemens®; Siemens, Deerfield, IL, USA). A partícula de baixa densidade (LDL-col) foi calculada usando a média da equação de Friedewald. Os triglicerídeos foram medidos pelo método do glicerol-fosfato peroxidase (enzimático colorimétrico) (ADVIA 1200 Siemens®; Siemens, Deerfield, IL, USA). A proteína C-reativa foi determinada por imunoquímica por nefelometria (Nefelômetro BN II Siemens®, Deerfield, IL, USA).

Alíquotas de soro foram mantidas -196° até a realização das determinações dos marcadores inflamatórios. As concentrações de oito marcadores (IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN- γ , E-selectina, MCP-1 e TNF α) foram simultaneamente determinadas pelo ensaio Multiplex (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A concentração de IL-1 β foi determinada por ELISA (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), assim como o LPS (My Bio Source, Sand Diego, CA, USA) com uma concentração mínima detectável de 5 ng/mL.

5.3 MICROBIOTA INTESTINAL

As amostras fecais foram coletadas na residência dos participantes ou no Centro de Pesquisas do HU. Após a entrega, foram mantidas sob refrigeração (7°C) por no máximo 24 horas antes de serem transportadas ao Laboratório de Genética

do Instituto do Coração da USP (INCOR), onde foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até o momento da análise.

O DNA bacteriano foi extraído usando o *kit* Maxwell® 16 DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, USA) no mesmo equipamento, segundo os protocolos estabelecidos pelo fabricante. As sequências de *primers* utilizadas foram 515F (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TATGGTAATT GT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TCCCTTGTCTCC* AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT), considerando que a região *Barcode, varia para cada amostra composta em uma corrida de sequenciamento.

A composição taxonômica das comunidades bacterianas foi obtida pela análise da região V4 do gene 16S rRNA usando a plataforma Illumina® MiSeq. As construções das bibliotecas de sequenciamento do DNA foram realizadas segundo instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, USA) e seguiram o mesmo fluxo descrito por Caporaso et al. (2012). Cada sequência apresentava tamanho de 150bp para ambos os lados e os devidos filtros de qualidade foram aplicados (Caporaso et al., 2012). O sequenciamento foi realizado por meio de *pool* de aproximadamente 30 amostras em uma placa, totalizando 10 corridas. Dessa forma, foram obtidas aproximadamente 7,5 milhões de leituras em cada placa, ou seja, em torno de 250 mil para cada amostra.

O Qiime (versão 1.9) foi utilizado como ferramenta para a assinatura taxonômica. Cada sequência foi submetida à consulta no banco de dados GreenGenes (versão 13.5) para que fossem comparadas a sequências previamente descritas. O arquivo BIOM gerado foi importado para o MEGAN para gerar a tabela

com o consenso taxonômico até o nível de gêneros. A partir dessa tabela, foram realizados os procedimentos estatísticos.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas empregadas para responder cada um dos objetivos específicos estão apresentadas com detalhes nos artigos que compõem o capítulo 6 desta tese.

5.5 ASPECTOS ÉTICOS

De acordo com as normas da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde, o projeto e o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) foram submetidos e aprovados pelos Comitês de Ética de Pesquisa da FSP-USP (CEP/FSP/154.416) e do HU (CEP/HU/1226.12), cujos pareceres encontram-se anexos (Anexos B e C).

Os dados coletados estão sendo usados exclusivamente para fins acadêmicos e científicos e permanecerão arquivados com o pesquisador por cinco anos, sendo posteriormente incinerados. Não houve qualquer identificação dos sujeitos da pesquisa durante a coleta ou ao término do estudo. Somente os pesquisadores tiveram acesso a eles, mantendo-os sob sigilo.

6 ARTIGOS

Segundo o regulamento vigente na ocasião da matrícula no Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da FSP/USP, a tese de doutorado deve apresentar o embasamento teórico e os métodos de modo detalhado, podendo ser seus resultados mostrados na forma de artigos científicos.

Quatro artigos complementares, sob o mesmo tema geral da tese, foram inseridos a seguir, respeitando o idioma do periódico selecionado. O primeiro deles (Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética) foi publicado nos Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. O segundo (*Diverse gut bacteria could be linked with distinct dietary patterns, inflammatory status and insulin resistance*), o terceiro (*Akkermansia muciniphila mediates effects of IFN γ on glucose metabolism*) e o quarto (*Presence of the gut enterotypes in an admixed population and correlations to lipid parameters*) foram submetidos a revistas internacionais. Além dos artigos, foi inserido um tópico com a descrição de outros achados relevantes que ainda não estão escritos na forma de artigo.

O consolidado desses principais achados e as conclusões dos quatro artigos estão contidos no capítulo final.

6.1 ARTIGO 1

revisão

Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética

Intestinal microbiota and cardiometabolic risk: mechanisms and diet modulation

Ana Carolina Franco de Moraes¹, Isis Tande da Silva¹,
Bianca de Almeida-Pititto¹, Sandra Roberta G. Ferreira²

RESUMO

A microbiota intestinal, adquirida no período pós-natal, é composta por grande diversidade de bactérias que desempenham diferentes funções no hospedeiro humano, entre elas a absorção de nutrientes, proteção contra patógenos e modulação do sistema imune. O conteúdo bacteriano intestinal ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que é influenciado por fatores internos e principalmente externos que modulam sua composição e função. Estudos indicam que a microbiota intestinal difere em indivíduos magros e obesos e ainda naqueles que mantêm hábitos alimentares diferentes. Há evidências de que as relações entre dieta, inflamação, resistência à insulina e risco cardiometabólico são em parte mediadas pela composição de bactérias intestinais. Conhecimentos sobre a microbiota poderão reverter em diferentes estratégias para manipular as populações bacterianas e promover saúde. Esta revisão aborda a relevância do conhecimento sobre o papel de fatores ou padrões alimentares na composição da microbiota, assim como mecanismos fisiopatológicos de doenças metabólicas crônicas e as potencialidades de prebióticos e probióticos sobre o perfil de risco cardiometabólico. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58(4):317-27

Descritores

Microbiota intestinal; hábitos alimentares; inflamação; resistência à insulina; adiposidade corporal

ABSTRACT

The gut microbiota obtained after birth is composed of a large range of bacteria that play different roles in the human host, such as nutrient uptake, protection against pathogens and immune modulation. The intestinal bacterial content is not completely known, but it is influenced by internal, and mainly by external factors, which modulate its composition and function. Studies indicate that the gut microbiota differs in lean and obese individuals, and in individuals with different food habits. There is evidence that the relationship between diet, inflammation, insulin resistance, and cardiometabolic risk are, in part, mediated by the composition of intestinal bacteria. Knowledge about the gut microbiota may result in different strategies to manipulate bacterial populations and promote health. This review discusses the relevance of understanding the role of dietary factors or patterns in the composition of the microbiota, as well as pathophysiological mechanisms of chronic metabolic diseases, and the potential of prebiotics and probiotics on the cardiometabolic risk profile. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58(4):317-27

Keywords

Gut microbiota; food habits; inflammation; insulin resistance; body adiposity

INTRODUÇÃO

Doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), como diabetes melito tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia e doença cardiovascular ateroscle-

rótica, assumem importância crescente na saúde pública mundial em decorrência de suas incapacitações e mortalidade precoce. A adiposidade corporal excessiva tem papel central na gênese dessas doenças, sendo alarman-

¹ Programa de Nutrição em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (FSP/USP), São Paulo, SP, Brasil
² Departamento de Nutrição, FSP/USP, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência para:
Sandra Roberta G. Ferreira
Departamento de Nutrição,
Faculdade de Saúde Pública,
Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 715
01246-904 – São Paulo, SP, Brasil
sandravf@usp.br

Recebido em 16/Ago/2013

Aceito em 24/Jan/2014

DOI: 10.1590/0004-27390000002940

te o aumento das cifras de obesidade no Brasil no mundo (1). Os determinantes de obesidade são múltiplos, envolvendo fatores genéticos e ambientais, dentre os quais se destacam as dietas com alta densidade energética e a inatividade física. O papel das bactérias que colonizam o intestino humano como agentes etiopatogênicos desta e de outras DCNTs ganha destaque diante por representarem alvo potencial de intervenção (2-6).

Estima-se que em 2050 ocorrerão 15,4 milhões de mortes no mundo em decorrência de DCNTs (7) e a população brasileira contribuirá de forma marcante para esse cenário. Dessa forma, justifica-se aprofundar o conhecimento sobre fatores envolvidos na sua gênese, dentre estes o papel da microbiota intestinal, cuja composição pode determinar predisposição ou proteção contra doenças.

A MICROBIOTA INTESTINAL DOS SERES HUMANOS

O trato gastrointestinal (TGI) humano é o sítio orgânico mais densamente povoado por micro-organismos comensais e simbióticos, na maioria bactérias, mas também fungos, *archaea* e vírus (8), abrigando dez vezes mais bactérias que o número de células que formam nosso organismo (9).

Indivíduos apresentam composições bacterianas distintas, sendo em parte definidas geneticamente e em outra determinadas por características individuais e ambientais, como modo de nascimento (parto normal ou cesariana), idade e hábitos alimentares, o que resulta numa grande variabilidade intra e interindividual (10-12). Uma das formas de avaliar as comunidades que habitam o TGI é pela classificação taxonômica que distribui as bactérias em filos, classes, ordem, família, gênero e espécie (8,12). Calcula-se que, na microbiota intestinal, existam cerca de mil espécies, distribuídas em mais de 50 diferentes filos. Estudos de metagenômica indicam que, na microbiota humana, haja cerca de 3,3 milhões de diferentes genes, 150 vezes mais que o genoma humano (9).

Na maioria dos indivíduos, cerca de 90% dos filos são Firmicutes e Bacteroidetes, sendo o restante composto por Actinobacterias (família Bifidobacteriaceae) e Proteobacterias (família Enterobacteriaceae). Em seguida, na ordem de frequência, aparecem os filos Synergistetes, Verrucomicrobia, Fusobacteria e Euryarchaeota, representando percentual pequeno da nossa

microbiota. As principais integrantes dos Firmicutes são as classes Bacilli, Clostridia e Mollicutes e dos Bacteroidetes são as Bacteroides, Flavobacteria e Sphingobacterias (8,9,12,13).

A passagem pelo canal vaginal no momento do parto já começa a influenciar a colonização do TGI do recém-nascido. No período pós-natal, o tipo e a duração da amamentação também são impactantes. Em comparação à microbiota intestinal adulta, os lactentes apresentam maior variabilidade da composição microbiana, abrigando menos espécies com menor estabilidade. Entre 2 e 3 anos de idade, o ecossistema passa a ser estável e comparável a de um adulto, dominado pelos filos Bacteroidetes e Firmicutes (14). Há estabilização da microbiota após a primeira infância, mas ocorrerão modificações em situações específicas ao longo da vida (10,11). Indivíduos adultos podem ter variações na proporção das bactérias em consequência de alterações ambientais ou de estados patológicos (3,8,15). Com o envelhecimento, observam-se redução na população de Bacteroides, Bifidobacteria e menor produção de ácidos graxos de cadeia curta, assim como crescimento de anaeróbios facultativos, tais como Fusobacteria, Clostridia, Eubacteria, e maior atividade proteolítica. Essas variações parecem estar relacionadas a perda de paladar, olfato e menor ingestão alimentar (16).

Apesar do crescente interesse no estudo da microbiota intestinal, há importantes lacunas no conhecimento sobre como esse ecossistema pode afetar a saúde, particularmente no que se refere às DCNTs. Esta revisão fornece uma visão geral dos avanços nesta área, informando sobre a participação da microbiota intestinal no contexto de frequentes anormalidades metabólicas que acometem o homem moderno e as possibilidades de modulação da alimentação.

MICROBIOTA, OBESIDADE E RISCO CARDIOMETABÓLICO

A obesidade participa na gênese da resistência à insulina bem como de morbidades, tais como a intolerância à glicose, dislipidemia e hipertensão arterial. A cascata de mecanismos intracelulares e eventos sistêmicos envolvidos na agregação desses fatores de risco continua sendo alvo de investigações. A esse contexto, acrescenta-se o interesse pelo papel da microbiota intestinal como fator intermediário entre componentes ambientais e comportamentais e a ocorrência de obesidade e os distúrbios metabólicos. O conhecimento sobre a participação

de bactérias intestinais em mecanismos fisiopatológicos evoluiu em grande parte com resultados obtidos em modelos animais (3,5,17-20).

A hipertrofia do tecido adiposo acarreta distúrbios metabólicos e hemodinâmicos pela produção de diversas adipocinas que têm papel na gênese da resistência à insulina e aterosclerose (21). Ambos os processos são mediados por citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6, IL-2 e INF- γ , secretadas tanto pelos adipócitos como por monócitos que infiltram esse tecido. Reconhece-se que indivíduo obeso apresenta um estado crônico de inflamação subclínica que favorece a resistência à insulina, evento central na geração de risco cardiometabólico (22).

No início deste século, consolidaram-se as evidências de associação da microbiota com excesso de peso corporal, a partir de pesquisas em modelos animais e também em humanos (3,4,5). Constatou-se que indivíduos magros e obesos apresentam diferente composição de microbiota. Diferentes composições da microbiota, especialmente relacionadas à alimentação, podem aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, alterando a expressão de genes do hospedeiro e induzindo estado patogênico capaz de facilitar o desenvolvimento de DCNTs (5,19). Considerando que a obesidade é o principal fator de risco para o DM2, o papel da microbiota também na sua gênese passou a ser alvo de investigação.

Os estudos pioneiros que observaram a relação da microbiota com obesidade foram realizados em animais livres de bactérias (*germ-free*) (2,3). Inicialmente, verificou-se que camundongos com microbiota intestinal preservada apresentaram 42% mais gordura corporal que os livres de bactérias (2). Na sequência, Ley e cols. observaram que camundongos ob/ob, geneticamente obesos, apresentavam maior proporção de Firmicutes em relação a Bacteroidetes quando comparados a controles eutróficos (3). Outros confirmaram essa observação, reforçando a hipótese da participação de certos filos de bactérias na regulação do balanço energético (17,23).

Em 2006, estudos em humanos obesos também verificaram menor proporção de Bacteroidetes em comparação com eutróficos. Ademais, quando perdem peso, a proporção de Firmicutes cai e torna-se mais parecida com a de indivíduos magros (4). Da mesma forma, Turnbaugh e cols., avaliando a microbiota intestinal de gêmeos, encontraram menor diversidade bacteriana em obesos, que apresentaram 75% de Actinobacteria, 25%

de Firmicutes e 0% de Bacteroidetes, enquanto magros apresentaram 0% de Actinobacteria, 58% de Firmicutes e 42% de Bacteroidetes (24).

Estudos envolvendo transplante da microbiota de roedores magros e obesos para animais *germ free* mostraram que, em poucas semanas, houve pequeno ganho de gordura corporal e maior extração de calorias provenientes da ração nos animais que receberam a microbiota de doadores obesos comparados àqueles que receberam a microbiota de doadores magros, mesmo sem acréscimo no consumo de ração. Esses dados sugerem que características da microbiota dos animais obesos *per se* contribuem para ganho ponderal (2,17,23).

Apesar de os estudos pioneiros terem encontrado associação desfavorável dos Firmicutes e benéfica dos Bacteroidetes em relação à obesidade e ao risco cardiometabólico, vale destacar que outros pesquisadores não obtiveram os mesmos resultados. Duncan e cols. observaram a mesma proporção dos dois filos em obesos e eutróficos, enquanto Schwirtz e cols., maior proporção de Bacteroidetes em relação aos Firmicutes em obesos (25,26). Portanto, não é universalmente constante o padrão de distribuição de filos da microbiota intestinal entre indivíduos obesos e magros.

Tem-se buscado o entendimento da participação dos gêneros e espécies em mecanismos fisiopatológicos do ganho de peso, admitindo-se que não somente a proporção de filos influenciaria a adiposidade corporal, mas também a diversidade dos micro-organismos da microbiota (8,24). Vale destacar que, no filo Firmicutes, há mais de 250 gêneros, enquanto no Bacteroidetes, cerca de 20 (27). Em estudo envolvendo crianças, as eutróficas apresentavam maior quantidade de *Bifidobacterium* spp. e menor de *Staphylococcus aureus* que aquelas com sobrepeso (11). Outros pesquisadores passaram a analisar a distribuição das bactérias segundo os grupos de gêneros e espécies da microbiota (8,15). Essa abordagem por agrupamentos mais específicos foi chamada de enterótipos. Em um estudo pioneiro, houve a identificação de três enterótipos, Bacteroides, Prevotella e Ruminococcus, com base em uma amostra de 39 indivíduos de seis diferentes nacionalidades (8).

Apesar de fortes evidências da participação da microbiota para o estado nutricional, oriundas tanto de modelos animais (3,4) como humanos (4,25), ainda não estão esclarecidas as implicações dessa compreensão no controle da obesidade. Se alterações da composição da microbiota são fatores causais de obesidade ou resultado dela, tem sido motivo de discussões na

literatura. Ainda não está estabelecido o melhor método (“padrão-ouro”) para pesquisa de simbiontes bacterianos, e o emprego de diferentes metodologias e tipos de amostras e análises dificulta a comparabilidade dos estudos e generalização dos achados (14). Além de diferenças de ordem metodológica, há problemas com o tamanho pequeno das amostras e uso inadequado de grupos controles.

Os mecanismos envolvidos na relação entre microbiota (e sua composição) e doenças metabólicas que elevam o risco cardiovascular não estão totalmente claros, mas alguns dos mais consistentes estão descritos a seguir (Figura 1).

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RELAÇÃO MICROBIOTA – DOENÇAS METABÓLICAS

Fasting Induced Adipose Factor – FIAF

O *Fasting Induced Adipose Factor* (FIAF) é um inibidor da lipase de lipoproteína (LPL), produzido pelo intestino, fígado e tecido adiposo. Quando suprimido pela ação da microbiota intestinal, há aumento da atividade da LPL que determina a maior absorção de ácidos graxos e acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos (2).

Investigações em animais FIAF-deficientes mostraram que, quando alimentados com dieta ocidental, ganham mais peso corporal que animais FIAF+/+ *wild-type*; coerente com sua maior adiposidade, apresentam também maiores concentrações de leptina e insulina (28).

Não está clara a real importância do FIAF intestinal em comparação ao produzido pelo tecido adiposo na regulação da deposição de triglicerídeos. Apesar de indícios de que possa favorecer o aumento da adiposidade corporal, a real contribuição do FIAF intestinal e sua regulação por meio de interações com populações bacterianas requerem mais investigações.

MONOFOSFATO-ADENOSINA PROTEÍNA QUINASE ATIVADA (AMP-Q)

O segundo mecanismo proposto envolve a inibição da via da 5'-monofosfato-adenosina proteína quinase (AMP-Q), enzima ativada pela adenosina monofosfato (AMP), que regula o metabolismo energético celular. Quando inibida, essa enzima ativa processos anabólicos e bloqueia catabólicos. Há evidências de que a AMP-Q desempenhe importante papel na regulação do metabolismo de ácidos graxos e da glicose, assim como na regulação do apetite. Observou-se que camundongos

Figura 1. Mecanismos envolvidos na relação entre microbiota intestinal e doenças metabólicas.

germ-free, mesmo com uma dieta hipercalórica, mantiveram peso, fato atribuído à elevação da atividade da AMP-Q no fígado e músculo esquelético e à maior oxidação de ácidos graxos, melhorando a sensibilidade à insulina. Tais achados sugerem que a presença da microbiota suprime a oxidação de ácidos graxos muscular via mecanismos que envolvem a inibição da AMP-Q e, portanto, favorecem a adiposidade corporal e a geração de resistência à insulina (28,29).

EIXO CÉREBRO-INTESTINAL

O terceiro mecanismo diz respeito à sensibilidade do epitélio intestinal a produtos bacterianos. Uma linha de investigação recente refere-se ao impacto que a microbiota intestinal pode exercer no comportamento alimentar e no sistema nervoso central (SNC), de modo a influenciar a regulação central do apetite e saciedade (30). O intestino humano é capaz de digerir fibras dietéticas em grande parte devido à síntese de enzimas pela microbiota. Tais enzimas permitem a metabolização de polissacarídeos não digeríveis a monossacarídeos e a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato (31). Esses AGCC representam importante fonte de energia, de modo a favorecer a adiposidade corporal. Além disso, difundem-se nas células de forma passiva ou por transportadores da via do ácido monocarboxílico e podem atuar como sinalizadores celulares (32).

Por outro lado, há outros efeitos indiretos que podem influenciar a motilidade intestinal e a produção de hormônios intestinais, apresentando papel na regulação da saciedade. Os ácidos graxos de cadeia curta possuem a capacidade de se ligar aos receptores acoplados a proteína G (GPCRs): Gpr41 e Gpr43. Atualmente, esses têm sido denominados de receptores de ácidos graxos livres (*free fatty acids receptors* – FFAR), FFAR2 e FFAR3, respectivamente (33-35). Tais receptores são expressos pelas células do epitélio intestinal, em células enteroendócrinas L, produtoras do peptídeo YY (PYY), hormônio que age inibindo a secreção gástrica, esvaziamento gástrico, contração da vesícula biliar e reduz o tempo de trânsito gastrointestinal. Dessa forma, ao serem ativados, esses receptores aumentam a produção de PYY, fato que favorece a redução da motilidade intestinal e propicia maior absorção de nutrientes do lúmen intestinal, em especial dos ácidos graxos de cadeia curta, que são substratos para a lipogênese no fígado. Da mesma forma, o PYY realiza suas funções hormonais no

SNC, inibindo neurônios orexígenos do núcleo arqueado, induzindo saciedade. Nesse contexto, camundongos Gpr41^{-/-}, com ou sem flora intestinal, apresentaram menor peso que camundongos Gpr41^{+/+}, apesar do mesmo consumo alimentar. Sugere-se que a Gpr41^{-/-} esteja associada com menor produção de PYY e com maior velocidade de trânsito intestinal, que reduz a absorção de nutrientes (AGCC) (33-35). A expressão de Gpr43 parece não estar envolvida na diferenciação do tecido adiposo, mas está possivelmente relacionada a processos inflamatórios associados ao TNF- α (36).

Estudos realizados com prebióticos indicaram que uma maior produção intestinal de ácidos graxos de cadeia curta está associada ao aumento da saciedade e consequente redução da ingestão alimentar. Tais efeitos em parte relacionam-se ao aumento dos *glucagon-like peptide* (GLP-1 e GLP-2) e PYY, que, em conjunto com redução da grelina, ocasionam efeitos hipotalâmicos relacionados ao mecanismo de recompensa (18,37,38). A estimulação do GLP-1 melhora a resposta glicêmica e insulinêmica, enquanto a secreção do GLP-2 em roedores obesos associou-se à redução da inflamação sistêmica (39).

O sistema endocanabinoide está envolvido em vários processos fisiológicos, entre eles apetite, motilidade intestinal, homeostase da glicose, função barreira do intestino e modulação da resposta inflamatória. A interação entre peptídeos estimulados pela microbiota intestinal e o sistema endocanabinoide parece estar envolvida no controle da permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica presente na obesidade (30,40).

No entanto, mais estudos são necessários para compreender com precisão a função desses receptores na ação parácrina e autócrina dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela microbiota intestinal.

LIPOLISSACARÍDEOS – LPS

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. Esse padrão dietético pode afetar a permeabilidade intestinal por meio da secreção de mediadores, tais como o fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-4 e IL-13, bem como via PAR-2 (receptor ativado por protease-2), que favorecem a translocação de LPS para circulação (5,20).

A identificação dos *Toll-Like Receptors* (TLR) permitiu entender como nosso organismo reconhece antígenos (como o LPS) e como ocorrem as reações pró-inflamatórias e distúrbios metabólicos. Essas anormalidades não estão presentes em animais *knockout* para esse tipo de receptor (19,20). Vários TLRs (TRL 1, 3, 5, 6, 7, 9 e 10) têm sido descritos como mecanismos para gerar inflamação e resistência à insulina, destacando-se especialmente as descobertas relativas ao TRL2, TRL4 e TRL5.

São inúmeras as evidências de que LPS induzem inflamação e resistência à insulina (5,41). Essas anormalidades são desencadeadas, em parte, pela ligação dos LPS ao complexo CD14 e ao TLR4 das células imunes inatas, funcionando como gatilho para síntese de citocinas pró-inflamatórias não apenas pelas células do sistema imune, como também pelo tecido adiposo, promovendo uma endotoxemia metabólica. Assim, altas concentrações circulantes de LPS, associadas à ingestão de dietas ricas em gorduras, podem desencadear inflamação subclínica crônica, que participa na gênese da obesidade, do DM2 e outras (5,42).

Estudo recente verificou que camundongos TLR2-/- alimentados com dieta balanceada apresentavam maior proporção de Firmicutes, aumento da inflamação pela maior captação de LPS e da resistência à insulina do que controles, e o tratamento com antibióticos foi capaz de reverter esse quadro. No mesmo estudo, camundongos *germ free* TLR2-/- apresentaram aumento da sensibilidade à insulina em tecido adiposo e muscular. Tais achados sugeriram fortemente que a microbiota participava de alterações inflamatórias e metabólicas (20).

Outros investigadores observaram que camundongos TLR5-/- apresentavam alterações na composição da microbiota intestinal e características da síndrome metabólica. Esses animais exibiam hiperfagia, dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e aumento da adiposidade corporal. Possivelmente, essas ações eram mediadas pelo LPS, atuando em TLRs (19,20).

Vários TLRs respondem às estruturas bacterianas e, uma vez ativadas, podem induzir ou atenuar a resistência à insulina. Tomadas em conjunto, as descobertas sobre os mecanismos de ação da microbiota sugerem que esse ecossistema pode contribuir diretamente para o metabolismo do hospedeiro, afetando a homeostase energética, modificando as atividades enteroendócrinas e, ainda,

contribuindo para a inflamação crônica subclínica, via sinalizações celulares pró-inflamatórias. No entanto, outros mecanismos moleculares devem estar envolvidos na modulação da microbiota (19,20). De todos os fatores exógenos capazes de alterar a composição da microbiota intestinal, nenhum deles é mais severo do que os causados pelos antibióticos. Inclusive, esses fármacos têm sido empregados em investigações experimentais sobre o papel da microbiota na geração de inflamação e resistência à insulina, defeitos básicos em doenças como a obesidade e o DM2 (20,43). Porém, a modulação da microbiota por meio da dieta talvez seja a forma mais simples, fisiológica, eficaz e de maior adesão para obter modificações no perfil de risco cardiometabólico.

MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

Micro-organismos que colonizam o intestino podem alterar a expressão gênica em células da mucosa intestinal e, em última instância, alterar a função do TGI. Em geral, a microbiota intestinal é composta em sua maioria por bactérias não patogênicas e promotoras de saúde, mas, em pequena parte, por bactérias potencialmente patogênicas.

A dieta se constitui em fator determinante das características da colonização intestinal. Esta é altamente influenciada pelos hábitos alimentares de longo prazo e por fenótipos do hospedeiro, não sendo abruptamente alterada por intervenções de curto prazo (15,44). Há importantes lacunas no conhecimento sobre como a alimentação e outros hábitos de vida poderiam alterar a composição da microbiota e como esta última modularia positiva ou negativamente o balanço energético (14). Algumas dietas podem modificar o padrão de colonização intestinal desde o início da vida (10,11). Sugere-se que a alimentação tenha efeito direto sobre a microbiota, que, em última análise, resultaria em mudanças em reações bioquímicas no lúmen intestinal (45). No entanto, a definição desse efeito ainda é algo a ser explorado, visto que a maioria dos estudos existentes apresenta fatores de confusão e/ou baixa comparabilidade por lançarem mão de diferentes modelos experimentais, tais como diferentes métodos de análise, espécie estudada (maioria dos estudos feitos em animais), falta de padronização dos graus de adiposidade corporal, da idade dos participantes e da dieta empregada. Os achados diante de diferentes padrões dietéticos ou nutrientes específicos serão discutidos em tópicos a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Modulação da microbiota intestinal e seus efeitos na microbiota intestinal e em desfechos bioquímicos e clínicos de fatores de risco cardiometabólicos

Autor	Amostra Espécie; número	Método	Dieta	Efeito microbiota	Efeito clínico/metabólico
Cani e cols., 2007 (5)	Camundongos, 32	16S rRNA	Hiperlipídica com oligofrutose	↑ <i>Bifidobacterium</i> spp.	↓ LPS e citocinas inflamatórias
Kadooka e cols., 2010 (58)	Humanos, 87	*	<i>Lactobacillus gasseri</i>	—	↓ Peso, cintura e adiposidade visceral
De Filippo e cols., 2010 (13)	Crianças Itália urbana, 15 Crianças África rural, 15	16S rDNA	Dieta hiperlipídica/pobre fibra Dieta vegetariana	↑ <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Shigella</i> e <i>Escherichia coli</i>) ↓ Bacteroidetes ↑ Firmicutes ↓ <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Shigella</i> e <i>Escherichia coli</i>) ↑ Bacteroidetes ↓ Firmicutes	—
Luoto e cols., 2010 (59)	Humanos gestantes, 256	*	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i>	—	↓ Risco de diabetes gestacional
McNulty e cols., 2011 (60)	Humanos, 7 pares de gêmeos Camundongos, 10	16S rRNA	Leite fermentado ^a	Sem alteração significativa	—
Goodman e cols., 2011 (47)	Camundongos <i>germ-free</i> transplantados com microbiota humana; 5	16S rRNA	Dieta hiperlipídica e hiperglicídica	↑ Firmicutes (<i>Erysipelotrichi</i>) ↓ Bacteroidetes (classe Bacteroidia)	—
Van Baarlen e cols., 2011 (57)	Humanos, 7	*	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. rhamnosus</i>	—	↑ Imunidade e funcionalidade da mucosa intestinal
Wu e cols., 2012 (15)	Humanos, 98	16S rRNA	Dieta hiperlipídica/pobre fibra Dieta hiperglicídica/rica fibra	Enterótipo tipo 1, rico em Bacteroides Enterótipo tipo 2, rico em Prevotella	—
Queipo-Ortuño e cols., 2012 (53)	Humanos, 10	16S rRNA	Polifenóis (vinho)	↑ Filos: Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes ↑ Gêneros: <i>Enterococcus</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Prevotella</i> ↓ Gênero <i>Clostridium</i> e grupo <i>Clostridium histolyticum</i> ↑ <i>Bifidobacterium</i> spp.	↓ Pressão, TG, CT, HDL-C e PCR
Koeth e cols., 2013 (50)	Humanos, 2.595	16S rRNA	Consumo ↑ de carne (↑ trimetilamina)	—	↑ Risco cardiovascular
Everard e cols., 2013 (40)	Camundongos, 35	16S rRNA	Oligofrutose	↑ <i>Akkermansia</i> ↑ Muco intestinal	↓ LPS
Dewulf e cols., 2013 (36)	Humanos obesos, 30	16S rDNA	Inulina/Oligofrutose	↑ <i>Bifidobacterium</i> spp. ↑ <i>Faecalibacterium</i> ↓ LPS	↓ Massa adiposa

* Não avaliaram a microbiota, mas o efeito dos probióticos em marcadores cardiometabólicos. — Avaliação não realizada. # *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, two strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* e *Streptococcus thermophilus*. LPS: lipopolissacarídeos. TMAO: N-óxido de trimetilamina. TG: triglicerídios. CT: colesterol total. PCR: proteína C reativa.

DIETA HIPERLIPÍDICA (“OCIDENTAL”)

Numerosas evidências apontam que a qualidade da dieta tem importante potencial modulador da composição da microbiota intestinal, principalmente no que se refere ao teor de gorduras, que, quando excessivo, pode afetar a integridade da mucosa e prejudicar sua

permeabilidade (5,6, 18,38,44,46). Estudos em roedores mostraram que a composição dietética tem papel determinante na modulação da microbiota intestinal, influenciando em 57% a variação da microbiota, enquanto apenas 12% estariam relacionados a fatores genéticos (44).

Em experimentos utilizando camundongos *germ-free* transplantados com microbiota intestinal humana, alimentados com ração com alto teor de gordura e açúcar, foram detectadas alterações rápidas na composição da microbiota intestinal com aumento no número de Firmicutes e redução de Bacteroidetes (47). Estudo recente em humanos detectou a presença mais frequente de dois enterótipos na microbiota intestinal: o tipo 1, rico em Bacteroides, fortemente associado ao consumo de proteína animal e gordura saturada, e o tipo 2, rico em Prevotella, associado à dieta baseada em carboidratos, composta por açúcares simples e fibras (15).

Há evidências consistentes de que o LPS induz inflamação subclínica e resistência à insulina. Em condições normais, a presença de LPS no lúmen intestinal não é nociva à saúde. Porém, certos padrões dietéticos podem exacerbar a transferência de LPS para circulação (5,6,18,38,46). A dieta hiperlipídica pode afetar indiretamente a permeabilidade intestinal por meio da ativação de mastócitos na mucosa intestinal, os quais a regulam diretamente por meio da secreção de mediadores – tais como TNF- α , IL-1B, IL-4 e IL-13 – que favorecem a translocação do LPS pela parede intestinal (5,18,38). Estudo envolvendo 201 homens sugeriu que alterações na dieta, com aumento do valor calórico total independente do teor de gordura, eram capazes de induzir endotoxemia metabólica (48). Esses resultados contrastam com os obtidos em modelo animal nos quais foi a dieta hiperlipídica que provocou aumento significativo nas concentrações circulantes de LPS (6,49).

Vale destacar que dietas com alto teor de gorduras podem induzir alterações na microbiota intestinal sem necessariamente associarem-se à obesidade. Estudo de ratos alimentados com ração hiperlipídica concluiu que essa alimentação causou redução significativa no número total de bactérias com aumento da proporção relativa das famílias Clostridiales e Bacteroidales, alterações estas encontradas independentemente do peso dos animais (49).

O efeito desse padrão dietético pode ser observado comparando-se a microbiota intestinal de 15 crianças com dieta tipicamente urbana (Florença, Itália) com 15 crianças que viviam em zona rural (Burkina Faso, África). Nas crianças africanas, observou-se menor proporção de bactérias da família Enterobacteriaceae (*Shigella* e *Escherichia coli*), maior quantidade de Bacteroidetes e menor quantidade de Firmicutes, comparadas às italianas. Vale destacar que a dieta das crianças africanas era basicamente vegetariana com baixo consumo de gordura e proteína animal, enquanto a das italianas era

tipicamente ocidental com pouca fibra e muita gordura. Esse estudo não forneceu detalhes sobre as proporções entre os tipos de gorduras consumidas (13).

A dieta tipicamente ocidental, além de hiperlipídica, provê um baixo consumo de fibras, que leva a menor produção pela microbiota de produtos imunomodulatórios considerados essenciais, tais como os ácidos graxos de cadeia curta (13).

Recentemente, além da relação entre gordura presente na carne vermelha e microbiota, verificou-se que a L-carnitina encontrada em sua composição é metabolizada pela microbiota intestinal. As bactérias transformam a L-carnitina em trimetilamina (TMA) que, por sua vez, é absorvida e metabolizada pelo fígado em N-óxido de trimetilamina, que acelera a aterosclerose em camundongos (50).

PREBIÓTICOS

Muito se tem investido na busca de nutrientes com capacidade seletiva de modificação favorável na microbiota intestinal, especialmente aumentando a quantidade de bifidobactérias e lactobacilos (31). Denomina-se prebiótico o ingrediente alimentar (galacto-oligossacarídeos, xilo-oligossacarídeos, fruto-oligossacarídeo, inulina, fosfo-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos, lactulose, pectina) que, após fermentação, promove mudanças na composição e/ou atividade de bactérias gastrointestinais, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (51).

Camundongos obesos tratados com prebióticos (oligofructose) apresentaram redução da concentração plasmática de LPS e citocinas, além de menor expressão hepática de marcadores de inflamação e de oxidação. A redução de inflamação associou-se à maior integridade do epitélio intestinal e melhor permeabilidade, possivelmente via GLP-1 e GLP-2 e modulação do sistema endocanabinoide (38,52). Recentemente, verificou-se que a administração desse mesmo prebiótico foi capaz de aumentar a quantidade de *Akkermansia muciniphila*, reduzida nos camundongos obesos (40). Essa bactéria mostra-se capaz de controlar a função barreira do intestino, o estoque de massa adiposa e a homeostase da glicose em animais obesos e diabéticos tipo 2. Apesar de ser Gram-negativa e conter LPS em sua superfície, a *A. muciniphila* é dotada de capacidade de aumentar a espessura do muco que reveste o epitélio intestinal, diminuindo, dessa forma, a endotoxemia. No entanto, ainda é precoce afirmar sobre seus benefícios de longo prazo no organismo humano (40,52).

Estudos em animais e humanos obesos revelam que o uso de prebióticos traz benefícios cardiometabólicos. Descrevem-se efeitos indutores de saciedade, perda de peso e redução de circunferência da cintura, e observam-se aumentos nos níveis plasmáticos de PYY, GLP-1 e GLP-2 (39). Os benefícios dos prebióticos têm sido atribuídos ao fato de serem fermentados por bactérias como *Bifidobacterium* spp. (6).

O vinho tinto tem sido apontado como possível modulador da microbiota; parte dos polifenóis contidos nessa bebida não é absorvida no intestino delgado, chegando intacto no cólon, onde agem como prebióticos por interagirem com a microbiota. Polifenóis do vinho tinto determinam aumento nas populações de Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes e nos gêneros *Enterococcus*, *Bacteroides* e *Prevotella* e redução dos patógenos do gênero *Clostridium* (*Clostridium histolyticum*). Porém, a elevação do *Bifidobacterium* spp. parece ser dos principais mecanismos protetores do vinho tinto, capazes de reduzir a colesterolemia e as concentrações de proteína C reativa (53).

PROBIÓTICOS

Probióticos são micro-organismos viáveis que conferem benefícios à saúde quando administrados em doses suficientes (54). As bactérias que têm sido frequentemente utilizadas como probióticos são Lactobacilos e Bifidobactéria, mas alguns streptococos e enterococos e até mesmo a *Escherichia coli* também se associam a efeitos benéficos (55).

Estudo realizado em mulheres obesas, por meio da suplementação de inulina durante três meses, verificou aumento das Bifidobactérias e Faecaliumbactéria com diminuição da concentração sérica de LPS e ligeira redução de tecido adiposo (56). Outros verificaram que baixas quantidades dessas bactérias associavam-se fortemente com obesidade e diabetes. Sugeriram que tal condição favoreceria translocação do LPS, portanto, endotoxemia e inflamação, uma vez que as bifidobactérias são essenciais para adequado funcionamento da barreira da mucosa intestinal (5,11,18).

Recentemente, os efeitos da suplementação com essas bactérias têm sido descritos em estudos clínicos que indicam sua capacidade em induzir alterações benéficas no TGI ou melhorar a funcionalidade das comunidades microbianas preexistentes por meio de mecanismos como a competição por nutrientes, produção de substratos de crescimento ou inibição e, ainda, modulação da

imunidade intestinal. Cepas probióticas de Lactobacilos melhoram a integridade da barreira intestinal, resultando na manutenção da tolerância imunológica e diminuição da translocação de bactérias pela mucosa intestinal (45). Voluntários saudáveis submetidos a experimento de seis semanas com adição de bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, e *L. rhamnosus*) apresentaram alterações na expressão de genes envolvidos na imunidade e outras funções da mucosa (57).

Kadooka e cols., utilizando *Lactobacillus gasseri* em indivíduos obesos, verificaram que os probióticos comparados ao placebo determinaram redução de adiposidade visceral, além de redução de peso corporal e circunferência da cintura (58). Em gestantes, pode-se observar que o uso de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis*) determinou menor risco de diabetes gestacional, além de comprovar segurança da utilização nessa condição, e potencial proteção contra doenças metabólicas futuras (59).

Entretanto, pouco se sabe sobre como esses probióticos poderiam impactar na população bacteriana intestinal autóctone, já que há uma estabilidade desse ecossistema, no qual as bactérias se autorregulam e variáveis de confusão são de difícil controle (60). Cepas probióticas de *Lactobacillus* podem melhorar a integridade da barreira intestinal, porém, leites fermentados contendo vários probióticos não alteraram a composição da microbiota intestinal de camundongos *germ free* e gêmeos monozigóticos (60). Assim, mais estudos são necessários para avaliar de que forma é possível induzir alteração duradoura da microbiota e como essas alterações se associariam com benefícios clínicos no hospedeiro de longo prazo.

CONCLUSÕES

Obesidade, distúrbios do metabolismo glicídico e lipídico e hipertensão arterial, que favorecem a ocorrência de doença cardiovascular aterosclerótica, representam graves problemas de saúde pública em todo o mundo, estando entre as principais causas de mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A compreensão sobre o papel dos micro-organismos intestinais representa importante caminho de investigação, capaz de contribuir para melhora desse quadro de morbimortalidade.

A microbiota intestinal ganhou atenção da comunidade científica devido à sua participação em mecanismos que favorecem saúde ou doença. Padrões dietéticos interferem na composição da microbiota e têm

relevância na modulação metabólica e regulação da adiposidade corporal. Maior proporção de Firmicutes em relação aos Bacteroidetes relaciona-se a obesidade e distúrbios metabólicos. Não apenas as proporções entre filos, mas também a variabilidade de micro-organismos, é relevante na fisiopatogênese de doenças. Identificação de gêneros e espécies em diferentes modelos experimentais tem possibilitado ampliar o conhecimento sobre os efeitos metabólicos da microbiota. Mais recentemente tem sido avaliado o impacto dos enterótipos nos processos fisiológicos e patológicos.

A supressão do *FIAP*, inibição da AMP-Q ativada, estímulo aos receptores FFAR e SECB e translocação de LPS são alguns mecanismos pelos quais a microbiota participa desses processos. Estes favorecem deposição de ácidos graxos, aumentam a adiposidade corporal, estimulam citocinas inflamatórias e induzem resistência à insulina, deteriorando o perfil cardiometabólico.

Intervenções adequadamente delineadas em fatores dietéticos são necessárias para compreender possíveis relações causais entre dieta e doenças, mediadas pela microbiota intestinal. O uso de probióticos e prebióticos na alimentação pode ser medida preventiva ou terapêutica, por favorecer uma composição saudável e maior funcionalidade da microbiota, diminuindo LPS circulante, portanto, a endotoxemia e a inflamação crônica subclínica. Porém, desconhece-se se em longo prazo poderia impactar na ocorrência de DCNTs.

Estudos em andamento sobre a relação “padrões de dietas, bactérias intestinais e resposta imune-inflamatória” deverão auxiliar na prevenção e no controle das principais doenças crônicas que afetam a humanidade.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Despesas, rendimentos e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.
2. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(44):15718-23.
3. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(31):11070-5.
4. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
5. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761-72.

6. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007;50(11):2374-83.
7. Alwan A, Maclean DR, Riley LM, d'Espaignet ET, Mathers CD, Stevens GA, et al. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *Lancet*. 2010;376(9755):1861-8.
8. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80.
9. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
10. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006;118(2):511-21.
11. Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(3):534-8.
12. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
13. de Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, 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*. 2010;107(33):14691-96.
14. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol*. 2012;7(1):91-109.
15. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y, Sue A, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. 2011;334(6052):105-8.
16. Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol*. 2007;102(5):1178-86.
17. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
18. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58(8):1091-103.
19. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010;328(5975):228-31.
20. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol*. 2011;9(12):e1001212.
21. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:996-1003.
22. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*. 2013;93(1):359-404.
23. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008; 3(4):213-23.
24. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4.
25. Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes*. 2008;32(11):1720-4.
26. Schwiertz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*. 2010;18(1):190-5.

27. Bajzer M, Seeley RJ. Physiology: obesity and gut flora. *Nature*. 2006;444(7122):1009-10.
28. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JL. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(3):979-84.
29. Kola B. Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. *J Neuroendocrinol*. 2008;20:942-51.
30. Muccioli GG, Naslain D, Bäckhed F, Reigstad CS, Lambert DM, Delzenne NM, et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol*. 2010;6(392):1-15.
31. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyle L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr*. 2010;104(Suppl 2):S1-63.
32. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25481-9.
33. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59(Suppl 2):251-62.
34. Holzer P, Reichmann F, Farzi A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides*. 2012;46(6):261-74.
35. Ulven T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Front Endocrinol*. 2012;3:111.
36. Dewulf EM, Ge Q, Bindels LB, Sohet FM, Cani PD, Richard SM, et al. Evaluation of the relationship between GPR43 and adiposity in human. *Nutr Metab*. 2013;10(1):11.
37. Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J Nutr*. 2007;137(11 Suppl):2547S-51S.
38. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D, et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satiety and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:1236-43.
39. Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb Cell Fact*. 2011;10(Suppl 1):S10.
40. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(22):9066-71.
41. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
42. Tsukumo DML, Carvalho-Filho MA, Carvalheira BC, Prada O, Hirabara SM, Schenka A, et al. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1986-98.
43. Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DM, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*. 2012;55(10):2823-34.
44. Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J*. 2010;4(2):232-41.
45. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuro-modulation. *Ther Adv Gastroenterol*. 2013;6(1):39-51.
46. Mani V, Hollis JH, Gabler NK. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr Metab*. 2013;10(1):6.
47. Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(15):6252-7.
48. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(5):1219-23.
49. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. 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*. 2010;299(2):G440-8.
50. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576-85.
51. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*. 2004;17:259-75.
52. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Muccioli GM, et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*. 2011;60(11):2775-86.
53. Queipo-Ortuño MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, et al. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(6):1323-34.
54. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:658-66.
55. Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *J Oral Microbiol*. 2009;1:1-11.
56. Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PG, Neyrinck AM, et al. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*. 2012; 62(8):1112-21.
57. Van Baarlen P, Troost F, Van der Meer C, Hooiveld G, Boekschoten M, Brummer RJ, et al. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(Suppl 1):4562-9.
58. Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(6):636-43.
59. Luoto R, Laitinen K, Nermes M, Isolauri E. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*. 2010;103(12):1792-9.
60. McNulty NP, Yatsunenko T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med*. 2011;26(3):106ra106.

6.2 ARTIGO 2

Diverse gut bacteria linked to distinct dietary patterns, inflammatory status and insulin resistance

Ana Carolina Franco de Moraes¹, Bianca de Almeida-Pititto¹, Gabriel da Rocha Fernandes², Everton Padilha Gomes³, Alexandre da Costa Pereira³,
Sandra Roberta Gouvea Ferreira¹

¹ Department of Epidemiology. School of Public Health, University of Sao Paulo, SP, Brazil

² Oswaldo Cruz Foundation, René Rachou Research Center, Minas Gerais, Brazil

³ Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute, University of Sao Paulo, Medical School, SP, Brazil

Abbreviated title: Diverse gut bacteria, distinct dietary pattern

Corresponding author:

Sandra Roberta G. Ferreira

Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo – Av. Dr. Arnaldo, 715 – Zip code 01246-904

Phone: 55 11 3061-7870 Fax: 55 11 3061-6601

E-mail: sandrafv@usp.br

Summary

Aims: To describe the abundance of major phyla and some genera in the gut microbiota of individuals according to dietary patterns and examine their associations with inflammatory markers, insulin resistance, and cardiovascular risk profile.

Methods: A total of 268 non-diabetic individuals were stratified into groups of dietary patterns (strict vegetarians, ovo-lacto-vegetarians, and omnivores). Clinical, biochemical, and circulating inflammatory markers were compared by ANOVA or Kruskal-Wallis. The taxonomic composition and phylogenetic structure of the microbiota were obtained through the analysis of the 16S rRNA gene. Samples were clustered into operational taxonomic units at 97% similarity using GreenGenes 13.5 database. **Results:** The omnivorous group showed higher values of anthropometry, insulin, HOMA-IR, and a worse lipid profile. Inflammatory markers exhibited a gradual and significant increase from the vegetarians and lacto-ovo-vegetarians to the omnivorous group. A greater abundance of *Firmicutes* ($40.7 \pm 15.9\%$) and *Bacteroidetes* ($39.5 \pm 19.9\%$) was found, with no differences between individuals with normal and excess weight. According to dietary patterns, the proportion of *Firmicutes* was lower and of *Bacteroidetes* was higher in strict vegetarians when compared to lacto-ovo-vegetarians and omnivores. At the genus level, strict vegetarians had a higher *Prevotella* rate and *Prevotella/Bacteroides* ratio than the other groups. They also had a lower proportion of *Faecalibacterium* than lacto-ovo-vegetarians, and both vegetarian groups had higher proportions than did omnivores. *Succinivibrio* and *Halomonas* from the *Proteobacteria* phylum were overrepresented in omnivores.

Conclusions: Our data support the fact that there are differences in gut microbiota composition of individuals consuming distinct dietary patterns, which in turn are

associated with inflammatory and metabolic profiles of the hosts. Based on recognized actions of commensal bacteria in the metabolism, we suggest that exposure to animal foods has an unfavorable impact on their proportions.

Key-words: microbiota – diet – biomarkers – insulin resistance

1. Introduction

Consistent evidence supports a role for dietary patterns in the genesis of non-communicable chronic diseases such as obesity, type 2 diabetes, hypertension, and cardiovascular disease [1]. The vegetarian diet has been associated with a beneficial cardiometabolic profile and lower rates of cardiovascular diseases [2,3]. The Adventist Health Study-2 prospectively showed the ability of this diet to reduce all-cause and cardiovascular mortality in vegetarians [4]. In contrast, the high-fat low-fiber Western diet has been associated with increased cardiovascular risk [5], largely due to body fat accumulation, known to trigger inflammation and insulin resistance [6,7].

In parallel, there is a growing interest in the influence of gut microbiota for the development of metabolic and cardiovascular diseases [8,9,10]. The microbiota of each individual is unique, partly defined by host genotype [11], but also by factors like age [12], breastfeeding [13], diet [14], lifestyle [15], and antibiotics [16], which result in a large interindividual variability. However, examining just at the phylum level, two major phyla, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, have been described as dominant in human gut microbiota worldwide [17,18]. Deeper analyses may be necessary to identify possible differences among populations.

Some studies have proposed that the impact of diet on cardiometabolic risk may occur by altering the gut microbiota [1,19,20], playing a role in obesity-related diseases [8,21,22]. Particularly, animal studies have contributed to understanding how bacterial communities influence energy extraction, fat deposition, and insulin sensitivity [23,24]. Lipopolysaccharides (LPS) present in outer membrane of gram-negative bacteria that are recognized by toll-like receptors (TLRs), which reduce the expression of tight junction proteins and increase intestinal permeability. LPS translocation activates inflammatory pathways and deteriorates insulin signaling [8,23,26].

Investigation on the role of gut microbiota in obesity-related diseases has reported an increased *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio (F/B ratio) [22], but findings are inconsistent [9,27]. Genetic and environmental factors – mainly dietary habits – should contribute to contrasting findings among populations. Scarce data are available in highly multiracial populations like Brazil. A deepening of the knowledge of the phylogenetic structure of microbial communities is needed to improve understanding of these inconsistencies, as well as the pathophysiological mechanisms. Some studies have detected the association of dietary patterns with the microbiota composition [18,28-32], but the underlying pathways are not completely clarified.

We hypothesized that diet affects the gut microbial composition influencing inflammation status, insulin resistance, and cardiovascular risk profile in individuals undergoing distinct dietary patterns. The aim of this study was to describe the gut microbiota composition at the genus level according to distinct dietary patterns (strict

vegetarian, lacto-ovo-vegetarian, and omnivore), and to test associations with biomarkers of cardiometabolic diseases in non-diabetic individuals.

2. Subjects and methods

- *Subjects*

A convenience sample of participants of a major study, ADVENTO – Analysis of Diet and Lifestyle for Cardiovascular Prevention in Seventh-Day Adventists (<http://www.estudoadvento.org>) – was invited to join in this cross-sectional analysis. The first 300 participants aged 35 to 65 years old were evaluated according to the eligibility criteria. Exclusion criteria were subjects with body mass index $\geq 40 \text{ kg/m}^2$, diabetes mellitus, history of inflammatory bowel diseases or persistent diarrhea, and use of antibiotics or probiotic or prebiotic supplements within the 2 months prior to data collection. A total of 268 subjects satisfied those criteria and were stratified according to their dietary pattern: strict vegetarian, lacto-ovo-vegetarian, and omnivore. Participants were examined at the Investigation Center of the University of Sao Paulo Hospital from March 2013 to October 2014. After overnight fasting, subjects visited the Center for physical examination to collect clinical data and biological samples. The Institutional Ethical Committee approved the protocol and participants signed Informed Consent Forms (study protocol # 154.416).

A trained staff collected dietary and clinical data. Dietary patterns were defined based on the referred food consumption for the last year. Participants were considered strict vegetarians when consuming no animal product (red meat, poultry, fish, eggs, milk, and dairy products <1 time/month); lacto-ovo-vegetarians when consuming dairy products and/or eggs ≥ 1 time/month, but no fish or meat (red meat,

poultry, and fish <1 time/month); and omnivores if they eat animal products (red meat, poultry, fish, eggs, milk, and dairy products) more than once a month [2].

- *Clinical data*

Height was obtained using a fixed stadiometer and weight with subjects wearing light clothing and no footwear, placed on a digital scale with 200 kg capacity, accurate to the nearest 100 g. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. Waist circumference was measured at the midpoint between the bottom of the rib cage and the top of the iliac crest during minimal respiration. The body composition was measured using a bioelectrical impedance analysis (BIA – InBody230; BioSpace, Seoul, Korea). Blood pressure was taken using a validated oscillometric device (Omron HEM 705CPINT, Omron Health Care, Lake Forest, IL, USA) after a 5-minute rest in a sitting position. Three measurements were taken at one-minute intervals. The mean of the blood pressure measurements was used in analysis.

- *Analytical measurements*

Blood samples were collected while fasting and during a 2-hour standard 75-gram oral glucose tolerance test, and were immediately centrifuged for plasma glucose and lipid profile determinations. Aliquots were frozen at -196°C for further determinations of insulin and inflammatory markers (C-reactive protein – CRP, LPS, interleukins, E-selectin, and tumor necrosis factor-alpha – TNF- α). Insulin resistance was estimated using homeostasis model assessment (HOMA-IR) [33]. The ratio TNF- α /IL-10 was calculated as markers of the magnitude of the inflammatory response [34].

Plasma glucose was measured by the hexokinase method (ADVIA Chemistry; Siemens, Deerfield, IL, USA). Plasma insulin was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Siemens, Deerfield, IL, USA). Total and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-chol) and triglycerides were measured by enzymatic colorimetric assay (ADVIA Chemistry; Siemens, Deerfield, IL, USA), while low-density lipoprotein cholesterol (LDL-chol) was calculated by the Friedewald equation. High-sensitivity C-reactive protein (CRP) was determined by immunochemistry (Dade Behring; Siemens, IL, USA), and LPS (My Bio Source, San Diego, CA, USA) using an ELISA kit. Concentrations of cytokines (IL-10, E-selectin, and TNF- α) were simultaneously determined by the Multiplex® (R&D Systems, Minnesota, MN, USA).

BMI higher than or equal to 25.0 kg/m² was considered weight excess. Categories of glucose tolerance were defined according to the American Diabetes Association criteria [35], and participants were grouped as normal tolerance or pre-diabetes (impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance). Hypertension was defined as blood pressure higher than or equal to 140/90 mmHg (either systolic or diastolic) or use of antihypertensive medication.

- *Gut microbiota*

Fecal samples were maintained under refrigeration (6°C) within a maximum of 24 hours after collection, and then the aliquots were stored at -80°C until analysis. DNA was extracted using the Maxwell® 16 DNA purification kit and the protocol carried out in the Maxwell® 16 Instrument according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). The taxonomic composition and phylogenetic structure of a microbial community were obtained through the analysis

of the 16S rRNA gene using the Illumina® MiSeq platform and the V4 region. DNA library construction and sequencing were performed following the manufacturer's instruction (Illumina, San Diego, CA, USA), and the workflow described by Caporaso *et al.* (2012) [36]. Samples were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at 97% similarity with Qiime v1.8 using the GreenGenes 13.5 database.

- *Statistical analysis*

Descriptive data were expressed as means and standard deviations or medians and interquartile range. Since distributions of some variables were skewed, they were log-transformed before analysis to achieve normality; some values in tables were back-transformed to return to the natural scale. Groups of participants classified according to the three dietary patterns were compared by ANOVA and Bonferroni post-hoc test, or by the Kruskal-Wallis test when indicated. Statistical analyses were carried out with IBM SPSS Statistics, version 22.

Participants were also stratified into two groups, omnivores and non-omnivores (strict plus lacto-ovo vegetarians), and the DESeq2 package was used for comparisons [36]. The package provides log₂ fold changes attributable to a given variable over the mean of normalized counts of operational taxonomic units (OTUs). The log₂ fold changes represent the comparison against the reference level, which is log₂ (Omnivores/Non-omnivores). If differences between omnivores and non-omnivores are equal to zero, it indicates that there is no difference between the means of the groups.

3. Results

Among 268 participants, 54.2% were women and 41.4% had weight excess. Stratifying according to dietary pattern, 66 were strict vegetarians, 102 lacto-ovo-vegetarians, and 100 omnivores, and groups did not differ according to male-to-female ratios and age (Table 1). The frequencies of weight excess [26% (95%CI 15–37) *versus* 38% (95%CI 29–47) *versus* 55% (95%CI 45–65), pre-diabetes [21% (95%CI 11–31) *versus* 29% (95%CI 20–38) and 36% (95%CI 27–45)], and hypertension [18% (95%CI 9–27) *versus* 26% (95%CI 17–34) and 33% (95%CI 24–43)] were higher in the omnivores than in lacto-ovo-vegetarians and strict vegetarians, respectively.

The omnivorous group showed higher mean values of anthropometric measurements including percentage of fat mass than the other groups (Table 1). The gradient in fasting plasma glucose across groups did not reach statistical significance, but values of insulin and HOMA-IR were different. Also, omnivores had a worse lipid profile. Medians of CRP, LPS, and TNF- α /IL-10 ratio exhibited gradual and significant increase from the strict vegetarians and lacto-ovo-vegetarians to the omnivorous group.

Table 1. Mean (standard deviation) or medians (interquartile range) of clinical data of participants according to dietary pattern.

	Strict vegetarian N = 66	Lacto-ovo- vegetarian N = 102	Omnivore N = 100	p- value
Age (years)	49.6 (8.5)	49.6 (8.6)	49.1 (8.2)	0.878
Body mass index (kg/m ²)	23.2 (4.1)	24.4 (3.9)	26.4 (4.7) ^{Ω‡}	<0.001
Waist circumference (cm)	79.7 (11.0)	81.7 (10.7)	86.5 (12.9) ^{Ω‡}	0.001
Fat mass (%)	27.1 (9.2)	30.2 (8.2)	32.6 (9.1) ^Ω	0.001
Systolic BP (mmHg)	115 (14)	118 (16)	119 (14)	0.328
Diastolic BP (mm Hg)	72 (9)	73 (10)	74 (10)	0.501
Plasma glucose (mg/dL)	91.8 (7.9)	92.3 (7.4)	94.6 (10.1)	0.076
2-h glucose (mg/dL)	112.7 (27.4)	115.7 (27.3)	118.5 (29.2)	0.425
Fasting insulin [#] (μUI /mL)	6.5 (1.8)	7.4 (1.7)	9.2 (1.7) ^{Ω‡}	<0.001
HOMA-IR [#]	1.5 (1.8)	1.7 (1.7)	2.1 (1.8) ^{Ω‡}	<0.001
Total cholesterol (mg/dL)	173.9 (36.9)	173.0 (35.6)	185.3 (33.6) [‡]	0.028
LDL-cholesterol (mg/dL)	99.3 (31.0)	110.7 (27.2)	113.6 (29.8) ^{Ω‡}	0.005
HDL-cholesterol [#] (mg/dL)	51.7 (1.3)	49.7 (1.3)	50.4 (1.3)	0.614
Triglycerides [#] (mg/dL)	96.5 (1.55)	92.2 (1.58)	93.4 (1.68)	0.831
LDL-chol/HDL-chol	2.0 (0.8)	2.1 (0.7)	2.3 (0.9) [‡]	0.034
C-reactive protein (mg/L)	0.5 (0.4-1.3)	0.8 (0.4-1.7)	1.1 (0.6-2.2)	0.007
Lipopolysaccharides (ng/mL)	31.8 (24.8-45.9)	33.5 (16.2-51.2)	39.5 (23.5-54.7)	0.008
Interleukin-10 (pg/mL)	0.3 (0.2-0.5)	0.3 (0.05-0.5)	0.3 (0.05-0.5)	0.402
TNF-α (pg/mL)	2.7 (1.7-3.6)	2.9 (1.5-5.0)	2.9 (1.9-4.5)	0.423
TNF-α/IL-10	7.3 (4.5-13.1)	10.5 (5.6-18.4)	11.7 (6.5-27.2)	0.015
E-selectin (pg/mL)	28.5 (17.5-53.5)	34.1 (21.0-48.4)	39.4 (23.5-54.7)	0.110

[#] Log-transformed for analysis; values were back-transformed to return to the natural scale ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test or Kruskal-Wallis test.

^Ω versus strict vegetarian. [‡] versus lacto-ovo-vegetarian. BP: blood pressure. HOMA-IR: insulin resistance index. TNF-α: tumor necrosis factor-alpha. IL-10: interleukin-10.

Thirteen phyla were identified and five were present in all the participants' fecal samples. Large relative amounts of *Firmicutes* ($40.7 \pm 15.9\%$) and *Bacteroidetes* ($39.5 \pm 19.9\%$) were found, followed by *Proteobacteria*. According to dietary patterns, the proportion of *Firmicutes* (Figure 1, panel A) was lower and that of *Bacteroidetes* was higher in the strict vegetarian group (Figure 1, panel B) when compared to lacto-ovo-vegetarians and omnivores.

Figure 1. Relative abundance of *Firmicutes* (A) and *Bacteroidetes* (B) according to dietary patterns. Central lines of the box plots are the means; box outline equals 1 SD; the bar denotes 2 SD. SV: strict vegetarian. LV: lacto-ovo-vegetarian. OM: omnivore. ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test. *p<0.05, **p<0.005.

No differences were found in the comparisons of the F/B ratio between subsets of participants with normal and weight excess, considering the whole sample as well as the stratification according to dietary pattern.

The abundance of OTUs according to dietary patterns was also compared at genus level. Strict vegetarians had higher rates of *Prevotella* genus that belongs to the *Bacteroidetes* phylum (Figure 2, panel A), and a higher *Prevotella/Bacteroides*

ratio (8.4 ± 0.3) than the other groups. On the other hand, strict vegetarians had a lower proportion of *Faecalibacterium* from the *Firmicutes* phylum than lacto-ovo-vegetarians, and both vegetarian groups had higher proportions than in omnivores (Figure 2, panel B).

Figure 2. Mean values of abundance (%) of genera belonging to the major phyla. **(A)** *Firmicutes* phylum: *Roseburia* and *Faecalibacterium* genera. **(B)** *Bacteroidetes* phylum: *Prevotella* and *Bacteroides* genera. ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Differences of selected OTUs between omnivores and non-omnivores (strict plus lacto-ovo-vegetarians), members of phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria*, assessed by the DESeq2, were shown in Figure 3. The omnivore group showed more than three times higher abundance of genera *Succinivibrio* and *Halomonas*, which belong to *Proteobacteria*, while non-omnivores had more OTUs from *Actinobacteria* and *Roseburia* genus from *Firmicutes*.

Figure 3. Log2 fold changes in mean reads of selected OTUs in omnivore and non-omnivorous group (strict plus lacto-ovo-vegetarians) at the deepest level identified. DESeq2 detected significant differences between dietary patterns at $p < 0.005$. Bacteria represented in circles at different colors belong to different phyla.

4. Discussion

The hypothesis that diet should influence low-grade inflammation, insulin resistance, and cardiovascular risk profile, via gut microbiota composition, is supported in the present study. Non-diabetic Brazilians undergoing distinct dietary patterns showed differences in their microbiota at the phylum and genus level. In comparison with omnivores, vegetarians had less *Firmicutes* and more *Bacteroidetes*. Moreover, among the *Firmicutes* from vegetarians, there was a predominance of genera associated with beneficial phenotypes, while among the *Bacteroidetes* an expected higher proportion of *Prevotella* was confirmed. We found subsidies supporting that exposure to animal foods could favor a pro-inflammatory

condition associated with microbial communities, previously described as contributors to the deterioration of the cardiometabolic profile.

In agreement with other studies [1,2,3], the Brazilian strict vegetarian Adventists exhibited a low-risk cardiometabolic profile, particularly when compared to the omnivores. Lower frequencies of obesity, hypertension, and pre-diabetes were observed in the strict vegetarians, similar to the results of the Adventist Health Study-2 [2] and also coherent with reports of fewer cardiovascular events in strict vegetarians [1]. Their food preferences – vegetables, fruits, and whole grains – are rich in fibers and micronutrients, which contribute to reduce oxidative stress, an underlying mechanism of these diseases [37]. Fiber-derived short-chain fatty acids (SCFA), mainly butyrate, acetate, and propionate, are facilitated by the presence of certain commensal bacteria that belong to phylum *Firmicutes* [29,39].

Our findings of lower proportion of *Firmicutes* and higher proportion of *Bacteroidetes* in SV compared to OM cannot be attributed to the differences in body adiposity of the participants. In fact, a meta-analysis did not confirm a previous assumption that obesity is associated with altered F/B ratio [27,40].

Analyzing particularly the *Firmicutes* subpopulations, we found that strict vegetarians had an increased abundance of the two most recognized butyrate-producing bacteria – *Roseburia* and *Faecalibacterium* [39,41] in comparison with omnivores. Butyrate is a major energy source for colonocytes and promotes the expression of tight junction proteins, enhancing the intestinal barrier function and consequently, it protects against the LPS translocation [28,39]. Our finding of lower LPS concentration in the strict vegetarian group is coherent with these effects. Also, the anti-inflammatory action of butyrate due to the nuclear factor κ B inhibition in

colonic cells [38,40] is supported by our results since lower values of inflammatory markers, CRP and TNF- α /IL-10 ratio, were detected in the same group. However, our study design precluded establishing cause-effect relationship. Therefore, despite belonging to the *Firmicutes* phylum, *Roseburia* and *Faecalibacterium* genera were shown to be associated with a beneficial metabolic profile in our vegetarians, characterized by lower body adiposity and better lipid profile and insulin resistance index, which are along the same line of previous reports [18,42].

Bacteroidetes were relatively more frequent in the microbiota of strict vegetarians than in omnivores, and their subpopulations were mainly composed of the genera *Prevotella* and *Bacteroides*. A higher *Prevotella/Bacteroides* ratio was seen in the strict vegetarians. These findings are consistent with others that reported higher *Prevotella* abundance in individuals with a plant-based diet and predominance of *Bacteroides* in non-vegetarians [14,18,31,32]. Also, investigations on the interaction between long-term dietary patterns and microbiota using genera clusters found an association of *Prevotella* enterotype with fiber-enriched diets, as well as *Bacteroides* enterotype with protein and animal fat [14]. One study is in disagreement, since no significant difference between the gut microbiota composition of vegetarians and omnivores was observed [28].

As far as omnivorous group is concerned, our observations of higher LPS, CRP, TNF- α /IL-10 ratio, and HOMA-IR values reinforce the previous hypothesis that a saturated fat-enriched diet could induce inflammation and insulin resistance [8,23,43]. We speculate that exposure to this dietary pattern could have contributed to alter the gut microbiota composition of omnivorous participants favoring an increase in LPS and generating endotoxemia. There is evidence that microbiota-

derived LPS by binding to TLR4 trigger inflammation, deteriorate insulin signaling, and cause metabolic disturbances [8,23,25]. TLR4-deficient mice are recognized as resistant to the inflammatory activation induced by obesity or free fatty acids and protected from insulin resistance [23]. We suppose that the consumption of animal foods may have favored an enrichment of gram-negative bacteria, increased the gut permeability and activated the immune response in the omnivorous participants. Their higher levels of some inflammatory markers might suggest this pathophysiological mechanism, anticipating the alterations in traditional cardiovascular risk factors. Actually, in the OM, we found an overrepresentation in some OTUs from the *Proteobacteria* phylum, which is known as a major group of gram-negative bacteria that prefer proteins as main energy source [32]. A similar result has already been reported in another study in which *Proteobacteria* were more abundant in European children fed with Western diet compared to Africans fed predominantly with vegetarian diet [18].

Also, overrepresentation of class *Bacilli*, belonged to *Firmicutes* phylum, was verified among omnivores, which could be somehow unexpected since these bacteria are not gram-negative. However, our result is concordant with a report of an association of high abundance of *Bacilli* with the Western diet [26] and diabetes [44], both conditions associated with low-grade inflammation and insulin resistance. Inflammatory markers and HOMA-IR were, in fact, higher in our omnivorous participants compared to vegetarians.

In lacto-ovo-vegetarians, we observed a higher proportion of *Firmicutes* and among these, of the *Faecalibacterium* genus. This finding was previously reported

[32] and it was suggested that dairy products and eggs might be substrates for these bacteria [45].

Our study has the strength of reporting data on the gut microbiota at a deep level in a considerable number of individuals consuming with distinct dietary patterns. As far as we know, this approach is unique in the Brazilian population. These data were associated with traditional factors and emergent cardiometabolic markers, suggesting possible mechanisms by which diet-modulated bacteria could participate in the genesis of diseases linked by the insulin resistance. However, the main limitation is the study design impeding the establishment of temporal or causal relationships.

We called attention to the importance of gut microbiota assessment for understanding how diet participates in the pathogenesis of cardiometabolic diseases. Whether deeper taxonomic classification could provide clues in the investigation of the pathophysiological mechanisms of these complex diseases requires further investigation.

In conclusion, our data support that there are differences in gut microbiota composition of individuals consuming according to distinct dietary patterns, which in turn are associated with host inflammatory and metabolic profiles. Based on recognized actions of commensal bacteria in metabolism, we suggest that exposure to animal foods has an unfavorable impact on their proportions. Further studies are needed to clarify their role for disease phenotypes, such as those linked by insulin resistance.

Acknowledgements

The present study was supported by FAPESP (2012/ 12626-9). Authors thank the Advento Study Group* and participants.

* Members of the Advento Study Group: IJM Bensenor, PA Lotufo, KRM Gomes, LCB Soares, V Kunz, NV Silva, LA Portes, DT Kanno, LF Sella, R França, MC Teixeira, S Gasparini, EOL Ferreira, B Bonifácio, TC Souza, FM Diaz, SCC Dammann, IR Pinheiro, WFS Costa, DMS Larchert, DF Nunes, JS Amorim, EM Reis, IP Manfrim, NV Ferreira, JLV Passos, E Barreto.

Declaration of interests

Nothing to declare

Contributor statements

Conceived and designed the study: SRGF, ACP.

Performed the data collection: ACFM, EPG.

Analyzed the data: ACFM, GRF, BAP, SRGF.

Contributed to the writing of the manuscript: ACFM, GRF, BAP, SRGF, EPG, ACP.

5. References

1. Sabaté J, Wien M. A perspective on vegetarian dietary patterns and risk of metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2015; 113(S2):S136-43.
2. Tonstad S, Butler T, Yan R, Fraser GE. Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(5):791-6.

3. Pettersen BJ, Anousheh R, Fan J, Jaceldo-Siegl K, Fraser GE. Vegetarian diets and blood pressure among white subjects: results from the Adventist Health Study-2 (AHS-2). *Public Health Nutr* 2012; 15(10):1909-16.
4. Orlich MJ, Singh PN, Sabaté J, et al. Vegetarian Dietary Patterns and Mortality in Adventist Health Study 2. *JAMA Intern Med* 2013; 173(13):1230-38.
5. Vang A, Singh PN, Lee JW, Haddad EH, Brinegar CH. Meats, processed meats, obesity, weight gain and occurrence of diabetes among adults: Findings from adventist health studies. *Ann Nutr Metab* 2008; 52(2):96-104.
6. Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, et al. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr* 2013; 109(S1):S1-34.
7. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014; 15(4):6184-223.
8. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1761-72.
9. Zupancic ML, Cantarel BL, Liu Z, et al. Analysis of the gut microbiota in the old order Amish and its relation to the metabolic syndrome. *PLoS One* 2012; 7(8): e43052. doi.org/10.1371/journal.pone.0043052.
10. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19(5):576-85.
11. Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(4):279-90.

12. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009; 9:123.
13. Le Huërou-Luron I, Blat S, Boudry G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev* 2010; 23(1):23-36.
14. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334(6052):105-8.
15. Petriz BA, Castro AP, Almeida JA, et al. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. *BMC Genomics* 2014; 15: 511.
16. Raymond F, Ouameur AA, Déraspe M, et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *ISME J* 2015; 1-14. doi.org/10.1038/ismej.2015.148.
17. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473(7346):174-80.
18. de Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, 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* 2010; 107(33):14691-96.
19. Kim MS, Hwang SS, Park EJ, Bae JW. Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5(5): 765-75.
20. Kong LC, Holmes B, Cotillard A, et al. Dietary patterns differently associate with inflammation and gut microbiota in overweight and obese subjects. *PLoS One* 2014; 9(10): e109434. doi.org/10.1371/journal.pone.0109434.

21. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(44):15718-23.
22. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* 2005; 102(31):11070-75.
23. Caricilli AM, Saad MJ. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients* 2013; 5(3):829-51.
24. Moraes ACF, Silva IT, Almeida-Pititto B, Ferreira SRG. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. *Arq Br Endocrinol Metab* 2014; 58(4):317-27.
25. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One* 2012; 7(10): e47713. doi: 10.1371/journal.pone.0047713.
26. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009; 1(6):6ra14. doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322.
27. Finucane MM, Sharpton TJ, Laurent TJ, Pollard KS. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. *PLoS One* 2014; 9(1):e84689. doi.org/10.1371/journal.pone.0084689.
28. Liszt K, Zwieler J, Handschur M, Hippe B, Thaler R, Haslberger AG. Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. *Ann Nutr Metab* 2009; 54(4):253-7.
29. Kabeerdoss J, Shobana DR, Regina MR, Ramakrishna BS. Faecal microbiota composition in vegetarians: comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *Br J Nutr* 2012; 108(6):953-7.

30. Matijašić BB, Obermajer T, Lipoglavšek L, Grabnar I, Avguštin G, Rogelj I. Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *Eur J Nutr* 2014; 53(4):1051-64.
31. Ruengsomwong S, Korenori Y, Sakamoto N, Wannissorn B, Nakayama J, Nitisinprasert S. Senior thai fecal microbiota comparison between vegetarians and non-vegetarians using PCR-DGGE and real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol* 2014; 24(8):1026-33.
32. Ferrocino I, Di Cagno R, De Angelis M, et al. Fecal microbiota in healthy subjects following omnivore, vegetarian and vegan diets: culturable populations and rRNA DGGE profiling. *PLoS One* 2015; 10(6):e0128669. doi: 10.1371/journal.pone.0128669.
33. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985, 28:412-9.
34. Goswami B, Rajappa M, Mallika v, Deepak KS, Kumar S. TNF- α /IL-10 ratio and C-reactive protein as markers of the inflammatory response in CAD-prone North Indian patients with acute myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 2009; 408:14-18.
35. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2015; 38(S1):S8-16.
36. Caporaso JG, Lauber CL, Walters W, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012; 6(8):1621-24.

37. Love MI, Anders S, Huber W. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; 15:550.
38. Savini I, Catani M, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci* 2013; 14(5):10497-538.
39. Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2011; 17(12):1519-28.
40. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. (2012). The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol* 2012; 7(1):91-109.
41. Miquel S, Martín R, Rossi O, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16(3):255-61.
42. Martínez I, Lattimer JM, Hubach KL, et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J* 2013; 7(2):269-80.
43. Tsukumo DML, Carvalho-Filho MA, Carvalheira BC, et al. Prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1986-98.
44. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS One*, 2010; 5(2):e9085. doi.org/10.1371/journal.pone.0009085.
45. Khan MT, Duncan SH, Stams AJM, van Dijk JM, Flint HJ, Harmsen HJM. The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic–anoxic interphases. *ISME J* 2012; 6(8):1578-85.

6.3 ARTIGO 3

***Akkermansia muciniphila* mediates effects of IFN γ on glucose metabolism**

Renee L. Greer¹ #, Xiaoxi Dong² #, Ana Carolina F. Moraes³, Ryszard A. Zielke², Gabriel R. Fernandes³, Ekaterina Peremyslova², Stephany Vasquez-Perez¹, Alexi A. Schoenborn⁴, Everton P. Gomes³, Alexandre C. Pereira³, Sandra R.G. Ferreira³, Aleksandra E. Sikora², Gregory A. Taylor⁵, Ajay S. Gulati⁴, Andrey Morgun^{2*}, Natalia Shulzhenko^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, ²College of Pharmacy, Oregon State University, Corvallis, OR, USA; ³Advento Study Group, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴Division of Pediatric Gastroenterology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA; ⁵Geriatric Research, Education, and Clinical Center, VA Medical Center, Departments of Medicine, Molecular Genetics and Microbiology and Immunology, Division of Geriatrics, and Center for the Study of Aging and Human Development, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA.

#-co-first authorship

*co-senior authorship

Correspondence to: N.S. natalia.shulzhenko@oregonstate.edu or A.M. anemorgun@hotmail.com

Address: 105 Dryden Hall, Oregon State University, Corvallis, OR 97330 USA

Abstract

There is growing appreciation for how extensive cooperation across seemingly distant biological systems is critical for human health. Microbiota is emerging as a frequent mediator of this cooperation with studies demonstrating the importance of cross-talk between microbiota and immunity for maintaining a healthy metabolism. In the current work, we addressed whether the gut microbiota mediates the established dialogue between interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) and glucose metabolism. By using systems biology approaches and analyzing transkingdom interactions we found that *Akkermansia muciniphila* mediates the effect of $\text{IFN}\gamma$ on glucose tolerance. In $\text{IFN}\gamma$ -deficient mice, *A. muciniphila* is significantly increased and restoration of $\text{IFN}\gamma$ levels reduces *A. muciniphila* abundance. Importantly, we show that *A. muciniphila* is required for the improvement of glucose tolerance that is observed in these mice. Furthermore, we have identified *Irgm1* as a critical $\text{IFN}\gamma$ -regulated gene responsible for control of *A. muciniphila* levels in the gut. Lastly, *A. muciniphila* is also linked to glucose parameters in humans, suggesting that this triologue between $\text{IFN}\gamma$, *A. muciniphila* and glucose tolerance might be an evolutionally conserved mechanism regulating metabolic health in mice and humans.

6.4 ARTIGO 4

Presence of the gut enterotypes in an admixed population and correlations to lipid parameters

Moraes ACF^a, Fernandes GR^b, Silva IT^a, Almeida-Pititto B^a, Gomes EP^c, Pereira AC^c,
Ferreira SRG^a

^a Department of Epidemiology. School of Public Health, University of Sao Paulo, SP, Brazil

^b Oswaldo Cruz Foundation, René Rachou Research Center, Minas Gerais, Brazil

^c Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute, University of Sao Paulo, Medical School, SP, Brazil

Corresponding author:

Sandra Roberta G. Ferreira

Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo – Av. Dr. Arnaldo, 715 – ZIP:01246904

Phone: 55 11 3061-7870 Fax: 55 11 3061-6601

E-mail: sandrafv@usp.br

Words counts: abstract (247) and text (2371), and number of references (27), figures (3) and tables (1).

Abstract

Background and Aims: Based on bacteria abundance in gut microbiota and their functional importance for the host, three enterotypes were identified. We investigated whether these enterotypes were present in Brazilians with diverse dietary patterns and examine their correlation with cardiometabolic risk profile. **Methods and Results:** A sample of 268 Brazilian adults with a variety of dietary patterns was analyzed for the identification of the enterotypes. The taxonomic composition and phylogenetic structure of their microbiota were obtained through the analysis of the 16S rRNA gene. Multidimensional cluster analysis and principal component analysis of metagenomes were performed. Three robust clusters were detected, resulting in distinct enterotypes, identifiable by the variation in the levels of one out of three genera or family. One hundred eleven subjects were clustered into enterotype 1 (*Bacteroides*), 55 into enterotype 2 (*Prevotella*) and 102 into enterotype 3 (*Ruminococcaceae*), which are similar to those originally described. LDL-cholesterol concentration was significantly lower in enterotype 2. Significant correlations ($p < 0.05$) between bacterial genera and lipids concentrations were found: in enterotype 1 [*Dorea* and total cholesterol ($r = 0.318$) and LDL-cholesterol ($r = 0.360$)], and in enterotype 2 [*Prevotella* and triglycerides ($r = 0.425$) and *Faecalibacterium* and HDL-cholesterol ($r = 0.345$)]. **Conclusions:** Our findings are in agreement with the existence of three main enterotypes in Brazilians, favoring the hypothesis that the main drivers of gut microbiota are not nation or continent-specific. The biological significance of these enterotypes remains unresolved; however, the correlations to lipid profile may suggest that these clusters could contribute to assess the cardiometabolic risk.

1. Introduction

Currently, metagenomics approaches have explored the microbiota diversity in an attempt to catalogue the gut microbiota [1,2]. The human microbiome is a dynamic ecosystem, whose variations occur as a result of environmental changes or pathological states [3]. Evidence has indicated that host genetics, geographic region, diet, medication and other environmental factors contribute to a large intra- and inter-individual variability in the gut microbiota composition during the life course [4,5]. Despite the huge amount of 10^{14} bacterial cells in human gut across populations, only two phyla are the most abundant, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, which are followed by *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia* [3,6].

Implications of the microbiota composition, particularly at deeper taxonomic levels, are unclear. Arumugan et al (2011) proposed to analyze the its composition through bacteria clusters – named enterotypes – based on most abundant species in a pool of populations, but also considering the importance of the functional composition for the host. Three enterotypes were identified, each one characterized by high levels of a single genus: *Bacteroides* (Enterotype 1), *Prevotella* (Enterotype 2) or *Ruminococcus* (Enterotype 3). Phylogenetic and functional differences among these enterotypes are supposed to reflect distinct combinations of bacterial chains with synergistic actions in the human host and, additionally, have the advantage of reducing the analysis complexity.

Further, investigations on the interaction between long-term dietary patterns and enterotypes found an association of *Prevotella* enterotype with carbohydrates and simple sugar, while the *Bacteroides* enterotype with animal protein and saturated fat [7]. Also, vegetarians showed enrichment of *Prevotella* enterotype.

Latter results diverged from the seminal study [6], since authors found that *Bacteroides* enterotype was fused to the *Ruminococcus* [7]. Other reports have augmented controversies about the number and differentiation of the enterotypes [8,9]. Considering that a variety of environmental factors influences the microbiome, it is important to investigate the presence of these enterotypes in different populations exposed to diverse environments.

This approach was already used in investigations involving Europeans, Americans and Asians [6,7,9,10], but not in highly racially mixed population. Therefore, it is of great interest to investigate whether these enterotypes could be present in Brazilians who are heterogeneous and also have diverse dietary habits. We hypothesized that the enterotypes previously reported are associated with biomarkers of cardiometabolic diseases.

The aim of this study was to investigate the presence of the enterotypes in a sample of Seventh-Day Adventists in Brazil, with diverse dietary patterns, and to examine their correlation with cardiometabolic risk profile.

2. Subjects and methods

For this cross-sectional study, a convenience sample of the first 300 participants of a major study named ADVENTO – Analysis of Diet and Lifestyle for Cardiovascular Prevention in Seventh-Day Adventists (<http://www.estudoadvento.org>) was planned. The study was approved by the institutional ethical committee of the School of Public Health, University of São Paulo (study protocol # 154.416); all subjects provided written consent. Inclusion criteria were age from 35 to 65 years and body mass index lower than 40 kg/m². Diabetes

mellitus, history of inflammatory bowel diseases, persistent diarrhea and use of antibiotics or probiotic or prebiotic supplements within the two months prior to the data collection were exclusion criteria. Thirty-two subjects did not fulfill eligibility criteria; a total of 268 subjects were stratified according to their dietary pattern adopted at least in the last year: strict vegetarian, lacto-ovo-vegetarian and omnivore, based on the food frequency questionnaire. Participants were considered strict vegetarians when consuming no animal products; lacto-ovo-vegetarians when consuming dairy products and/or eggs and omnivores if they eat animal products more than once a month [11]. Skin color was categorized in Caucasians and non-Caucasians.

Weight was measured using a Filizola digital scale with 200 kg capacity, height using a fixed stadiometer and body mass index was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. Blood pressure was measured with a standard oscillometric device (Omron HEM 705CPINT, Omron Health Care, Lake Forest, IL, USA). Blood samples were taken after an overnight fasting. Plasma glucose was measured by the hexokinase method (ADVIA Chemistry; Siemens, Deerfield, IL, USA). Measurements of total cholesterol, triglyceride and high-density lipoprotein were assessed by enzymatic methods. Low-density lipoprotein cholesterol was calculated by the Friedewald equation.

- *Gut microbiota*

The analysis of the 16S rRNA gene (V4 region) was carried out by Illumina® MiSeq platform using fecal samples maintained under refrigeration (6°C) within a maximum of 24 hours after collection, and the aliquots stored at -80°C until analysis. The Maxwell® 16 DNA purification kit was used to extract DNA and the

manufacturer's instruction was used to carry out the protocol in the Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA). The manufacturer's instruction was also followed for DNA library construction and sequencing DNA library construction (Illumina, San Diego, CA, USA) and the Caporaso et al [12] workflow was used. Qiime v1.8 using gg13.5 database was employed to cluster samples into operational taxonomic units (OTUs) at 97% similarity.

- *Statistical analysis*

Means and standard deviations or medians and interquartile range were used to express descriptive data. Variables with skewed distributions were log-transformed before analysis to achieve normality. Variables were compared according to enterotypes using ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test. Chi-square test was employed to compare frequencies. The two-tailed Pearson correlation was used to test association between variables. Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 22 (IBM, Armonk, NY, USA), and R for microbiota analyses.

To determine the enterotypes, the three most abundant genera were assessed using the Calinski-Harabasz (CH) index for the optimal number of clusters and the methods previously described [6,13] and available in <http://enterotype.embl.de/enterotypes.html>.

2. Results

Among 268 participants, 54.2% were women, 54% Caucasians and 41.4% had weight excess (body mass index ≥ 25 kg/m²) and mean age of 49.4 ± 8.4 years. According to dietary patterns, 66 were strict vegetarians, 102 lacto-ovo-vegetarians

and 100 omnivores and groups did not differ according to age, gender distribution and skin color.

As expected, considering the entire sample, higher abundance rates of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla were found (Figure 1, panel A). Among the most abundant genera, 50.8% were represented by *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* and *Prevotella* (Figure 1, panel B).

A)

B)

Figure 1. Box plot of the phylogenetic profile of the gut microbiome of the participants distributed by phylum (A) and genus (B) abundances. A) The 4 most abundant phyla are shown and the rest as others. B) The 20 most abundant genera are colored according to their respective phylum. Central lines of the box plots are the means; box outline equals 1 SD; the bar denotes 2 SD.

Stratifying the whole sample according to enterotypes, 111 were assigned to enterotype 1, 55 to enterotype 2 and 102 to enterotype 3 enriched in *Bacteroides*, *Prevotella* and *Ruminococcaceae*, respectively (**Figure 2, Panel A and B**).

A)

B)

Figure 2. Enterotypes identified in the sample. A) Principal Coordinate Analysis showed the samples colored by the enterotype they belong to. Blue is enterotype 1, red is enterotype 2 and green is enterotype 3. B) Relative abundances of *Bacteroides*, *Prevotella* and *Ruminococcaceae* in each enterotype. Central lines of the box plots are the means; box outline equals 1 SD; the bar denotes 2 SD.

The frequencies of participants consuming each type of diet in the enterotype were compared and a higher number of strict vegetarians (40.0%) was found in enterotype 2 ($p = 0.038$). The comparisons of variables between subsets of enterotypes (Table 1) showed that only the mean values of LDL-cholesterol concentrations were lower in enterotype 2 when compared to enterotype 1 (96 ± 23 versus 109 ± 32 mg/dL, $p = 0.03$).

Table 1. Mean values (standard deviation) data according to enterotypes (N = 268).

	Enterotype 1 n = 111	Enterotype 2 n = 55	Enterotype 3 n = 102	P- value
Body mass index (kg/m ²)	25.1 (4.6)	24.5 (4.2)	24.8 (4.5)	0.743
Systolic BP (mmHg)	115 (15)	120 (12)	116 (14)	0.060
Diastolic BP (mmHg)	72 (10)	75 (8)	72(10)	0.184
Plasma glucose (mg/dL)	93 (8)	94 (12)	92 (7)	0.337
Total cholesterol (mg/dL)	181 (40)	169 (25)	179 (35)	0.093
LDL-cholesterol (mg/dL)	109 (32)	96 (23) ^Ω	105 (29)	0.036
HDL-cholesterol [#] (mg/dL)	50 (1)	49 (1)	51 (1)	0.648
Triglycerides [#] (mg/dL)	93 (2)	100 (1)	91 (2)	0.458

[#] Log-transformed for analysis and values in tables were back-transformed to return to the natural scale. ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

^Ω versus enterotype 1. BP = blood pressure.

Based on these findings, correlations between lipids with the relative abundance of several bacteria were examined, but only four significant associations were found. The mean relative abundance of *Dorea* in the whole sample was 0.004. In enterotype 1, this genus was significantly correlated to total ($r = 0.318$, $p = 9.08\text{E-}04$) and LDL-cholesterol concentrations ($r = 0.360$, $p = 1.52\text{E-}04$). In enterotype 2, *Prevotella* ($r = 0.425$, $p = 0.0012$) and *Faecalibacterium* ($r = 0.345$, $p = 0.0098$) genera were shown to be correlated to triglycerides and HDL-cholesterol concentrations, respectively (Figure 3).

Figure 3. Correlations between relative abundance of OTUs and lipids concentrations. Blue is enterotype 1 – ET1, red is enterotype 2 – ET2 and green is enterotype 3 – ET3. * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$.

3. Discussion

The hypothesis about the existence of three enterotypes in populations is independent of nation or continent was reinforced in the present study. Also, for our knowledge, this is the first study including subjects with diverse dietary patterns, in which differences in their lipid profile among the enterotypes were observed. In enterotype 1, previously associated with protein and animal fat consumption [7], *Dorea* genus abundance was shown to be correlated to total and LDL-cholesterol concentrations. Interestingly, *Prevotella* genus abundance in enterotype 2 was correlated to triglycerides concentration, which is coherent with an enriched carbohydrate diet as previously described [7]. Additionally, in the latter enterotype, the finding of an association of *Faecalibacterium* with HDL-cholesterol had not been described yet. However, this genus has already been related to health due to its butyrate-producing property [14,15].

Main phyla that dominate the gut human microbiota were detected among our Brazilian sample as well the most common genera. Since even among Brazilians, who represent a very mixed population, the three bacterial main drivers were identified [6], it is possible that knowledge on the complex investigation of the gut microbiota could be generalized. In contrast with the original description, our metagenomics analysis was based on the 16S rRNA gene sequencing instead of shotgun sequencing, which is more expensive and less available worldwide [16]. As

a consequence, for enterotype 3 a less deep taxonomic classification for *Ruminococcus* was achieved. Reports from other populations, like in Americans, Koreans and Danish, failed to demonstrate three clusters, having identified just the enterotype 1 and 2 [7,9,10,17]. This difference has been attributed to the methodology used but not to particularities of the populations [2].

An opportunist characteristic of our sample was the diversity of dietary patterns which could allow understanding physiological roles of bacteria present in the enterotypes. The inclusion of strict vegetarians, known to have a more favorable cardiometabolic profile, allowed to investigate how those subjects are distributed among the enterotypes. People consuming plant-based diet, as our strict vegetarians (data not shown), are leaner and have lower blood pressure levels and better parameters of glucose and lipid metabolism [18]. Therefore, the expected higher proportion of strict vegetarians was found in enterotype 2. Despite that, no differences regarding anthropometry and plasma glucose were observed which is in agreement with previous studies [6,10]. However, a lower mean value of LDL-cholesterol concentration was found in subjects belonging to enterotype 2. This finding is consistent with the knowledge that the absence of animal food consumption results in lower lipids concentrations [18,19], except HDL-cholesterol.

We also investigated correlations of OTUs within the enterotypes in an attempt to screen bacterial communities involved in the lipid metabolism. Some correlations with genera were detected. The positive correlation of *Faecalibacterium* abundance with HDL-cholesterol concentration could suggest a cardioprotective role for this genus. However, this correlation was not detected in another study [20]. These are butyrate-producing bacteria that are known by their anti-inflammatory properties in

several cells including the colonic macrophages [21]. It was demonstrated that butyrate is able to activate GPR109A which in turn regulates lipid homeostasis [22]. Our data of a direct correlation between *Prevotella* abundance and triglycerides concentration is consistent with a previous report [23]. Considering that, in the enterotype 2, there is an increased proportion of strict vegetarians, known to have high consumption of carbohydrates [24], higher triglycerides concentrations could be somehow expected [25,26].

The results regarding enterotype 1 indicate that the abundance of *Dorea* is linked to worse lipid profile, since it was positively associated with total and LDL-cholesterol concentrations, despite the relatively low rate of these bacteria in the sample studied. This association of this genus with serum lipids was previously described in an animal study [27].

In conclusion, our data support that the same enterotypes are widely found around the world, independently of racial admixture and dietary patterns. The correlations with lipid profile herein detected suggested that these gut bacteria clusters may contribute to assess the cardiometabolic risk. Prospective studies are needed to clarify their role for diseases' phenotypes.

Acknowledgements

The present study was supported by FAPESP (2012/ 12626-9). Authors thank the Advento Study Group* and participants.

* Members of the Advento Study Group: IJM Bensenor, PA Lotufo, KRM Gomes, LCB Soares, V Kunz, NV Silva, LA Portes, DT Kanno, LF Sella, R França, MC Teixeira, S Gasparini, EOL Ferreira, B Bonifácio, TC Souza, FM Diaz, SCC

Dammann, IR Pinheiro, WFS Costa, DMS Larchert, DF Nunes, JS Amorim, EM Reis, IP Manfrim, NV Ferreira, JLV Passos, E Barreto.

References

- [1] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59–65. doi:10.1038/nature08821.
- [2] Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, et al. A Guide to Enterotypes across the Human Body: Meta-Analysis of Microbial Community Structures in Human Microbiome Datasets. *PLoS Comput Biol* 2013; 9:e1002863. doi:10.1371/journal.pcbi.1002863.
- [3] Ley RE, Peterson D a, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837–48. doi:10.1016/j.cell.2006.02.017.
- [4] Wang J, Linnenbrink M, Künzel S, Fernandes R, Nadeau M-J, Rosenstiel P, et al. Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:E2703–10. doi:10.1073/pnas.1402342111.
- [5] Nam Y-D, Jung M-J, Roh SW, Kim M-S, Bae J-W. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One* 2011; 6:e22109. doi:10.1371/journal.pone.0022109.
- [6] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473:174–80. doi:10.1038/nature09944.

- [7] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y, Sue A, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes 2012; 334:105–8. doi:10.1126/science.1208344.Linking.
- [8] Ou J, Carbonero F, Zoetendal EG, DeLany JP, Wang M, Newton K, et al. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am J Clin Nutr* 2013; 98:111–20. doi:10.3945/ajcn.112.056689.
- [9] Roager HM, Licht TR, Poulsen SK, Larsen TM, Bahl MI. Microbial enterotypes, inferred by the *Prevotella*-to-*Bacteroides* ratio, remained stable during a 6-month randomized controlled diet intervention with the new nordic diet. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80:1142–9. doi:10.1128/AEM.03549-13.
- [10] Lim MY, Rho M, Song Y-M, Lee K, Sung J, Ko G. Stability of Gut Enterotypes in Korean Monozygotic Twins and Their Association with Biomarkers and Diet. *Sci Rep* 2014; 4:7348. doi:10.1038/srep07348.
- [11] Tonstad S, Butler T, Yan R, Fraser GE. Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:791–6. doi:10.2337/dc08-1886.
- [12] Caporaso JG, Lauber CL, Walters W a, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012; 6:1621–4. doi:10.1038/ismej.2012.8.
- [13] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Addendum: enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2014; 506:516. doi:10.1038/nature13075.
- [14] Chassard C, Lacroix C. Carbohydrates and the human gut microbiota. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013; 16:453–60. doi:10.1097/MCO.0b013e3283619e63.

- [15] Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16:255–61. doi:10.1016/j.mib.2013.06.003.
- [16] Aßhauer KP, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics* 2015; 31:2882–4. doi:10.1093/bioinformatics/btv287.
- [17] Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor A a. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One* 2012; 7:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0034242.
- [18] Le LT, Sabaté J. Beyond meatless, the health effects of vegan diets: Findings from the Adventist cohorts. *Nutrients* 2014; 6:2131–47. doi:10.3390/nu6062131.
- [19] Bradbury KE, Crowe FL, Appleby PN, Schmidt J a, Travis RC, Key TJ. Serum concentrations of cholesterol, apolipoprotein A-I and apolipoprotein B in a total of 1694 meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans. *Eur J Clin Nutr* 2014; 68:178–83. doi:10.1038/ejcn.2013.248.
- [20] Brahe LK, Le Chatelier E, Prifti E, Pons N, Kennedy S, Hansen T, et al. Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity. *Nutr Diabetes* 2015; 5:e159. doi:10.1038/nutd.2015.9.
- [21] Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients* 2015; 7:2839–49. doi:10.3390/nu7042839.
- [22] Elangovan S, Pathania R, Ramachandran S, Ananth S, Padia RN, Lan L, et al. The niacin/butyrate receptor GPR109A suppresses mammary tumorigenesis by

inhibiting cell survival. *Cancer Res* 2014; 74:1166–78. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.*Innate*.

[23] Hu H-J, Park S-G, Jang HB, Choi M-G, Park K-H, Kang JH, et al. Obesity Alters the Microbial Community Profile in Korean Adolescents. *PLoS One* 2015; 10:e0134333. doi:10.1371/journal.pone.0134333.

[24] O'Neill B. Erratum: A scientific review of the reported effects of vegan nutrition on the occurrence and prevalence of cancer and cardiovascular disease. *Biosci Horizons* 2013; 6:197–212. doi:10.1093/biohorizons/hzt008.

[25] Huang Y-W, Jian Z-H, Chang H-C, Nfor ON, Ko P-C, Lung C-C, et al. Vegan diet and blood lipid profiles: a cross-sectional study of pre and postmenopausal women. *BMC Womens Health* 2014; 14:55. doi:10.1186/1472-6874-14-55.

[26] Parks EJ. Effect of dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in humans. *J Nutr* 2001; 131:2772S – 2774S.

[27] Chen D, Yang Z, Chen X, Huang Y, Yin B, Guo F, et al. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* hsryfm 1301 on the intestinal microbiota of a hyperlipidemic rat model. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14:386–94. doi:10.1186/1472-6882-14-386.

6.5 RESULTADOS E COMENTÁRIOS ADICIONAIS

A fim de avaliar se diferenças nos hábitos alimentares da amostra estudada afetariam as condições de saúde mediadas pelo estado inflamatório induzido pela composição da microbiota intestinal, em uma abordagem inicial, os marcadores inflamatórios disponíveis ($n = 11$) foram estratificados em tercís. A ideia seria verificar se a atenuação da inflamação subclínica se associava ao vegetarianismo, uma vez que, indivíduos com essa dieta apresentaram melhor perfil de risco cardiometabólico.

No entanto, devido à alta variabilidade interindividual, decidiu-se por definir categorias de estado inflamatório usando a análise de componente de *cluster* em duas fases (*two-step cluster component analysis*) buscando identificar associações com a composição da microbiota.

Usando esta análise de *cluster*, vários modelos foram construídos incluindo todos os marcadores inflamatórios do total de 268 indivíduos não diabéticos estudados. Contudo, houve a necessidade de excluir algumas variáveis do modelo final devido ao comportamento errático apresentado. Para exemplificação, a Figura 2 (Painel A) retrata a qualidade do *cluster* considerando os onze marcadores inflamatórios disponíveis. Após a exclusão de oito biomarcadores, outro modelo de *cluster*, incluindo TNF- α , MCP-1 e E-selectina mostrou ligeira melhora, embora a qualidade de *cluster* permanecia abaixo do desejável, na categoria "*fair*" (Figura 2, Painel B).

A)

B)

Figura 2. Qualidade do *cluster* considerando os dados de marcadores inflamatórios circulantes de 268 indivíduos. **A)** Relativos a IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN- γ , selectina-E, MCP-1, TNF α , PCR e LPS. **B)** Relativos a MCP-1, selectina-E e TNF- α .

Após várias tentativas para incluir a maioria das variáveis, o melhor resultado foi obtido com os dados de MCP-1 e selectina-E. A qualidade do *cluster* para este modelo foi classificada como "good" com valor de 0,65 em escala de -1 a 1 (Figura 3).

Figura 3. Qualidade do *cluster* considerando dados de concentrações de MCP-1 e selectina-E de 268 indivíduos

O modelo final foi composto considerando os dados relativos às concentrações de MCP-1 e selectina-E da amostra de 268 indivíduos. Estes dois *clusters* foram chamados de "*major*" (*cluster* 1, $n = 121$) e "*minor*" inflamação de baixo grau (*cluster* 2, $n = 147$), cujas características estão apresentadas na figura 4 e tabela 1.

Figura 4. Distribuição de 268 indivíduos no modelo final de *clusters* considerando dados de concentrações de MCP-1 e E-selectina.

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) dos marcadores centroides, MCP-1 e selectina-E, em *clusters* do modelo final.

		MCP-1		Selectina-E	
		Média	DP	Média	DP
Cluster	1	403,48	98,73	53,67	12,97
	2	156,71	85,39	22,78	9,05
	Combinado	268,12	153,32	36,73	18,90

Para confirmar a consistência destes *clusters*, foram comparadas as concentrações dos demais marcadores inflamatórios em cada categoria (Tabela 2). Os resultados confirmaram que no *cluster 1* ("*major*" *low-grade inflammation*) os indivíduos apresentavam valores medianos de citocinas como a IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ e TNF- α compatíveis com inflamação subclínica mais acentuada.

Tabela 2. Medianas (intervalos interquartis) das concentrações de marcadores inflamatórios de acordo com o *cluster*.

	Cluster 1 (<i>major low-grade inflammation</i>) N = 121	Cluster 2 (<i>minor low-grade inflammation</i>) N = 147	P-valor*
IL-1 β (pg/mL)	10,98 (9,55-12,36)	10,55 (9,58-11,58)	0,156
IL-6 (pg/mL)	1,01 (0,50-1,42)	0,40 (0,05-1,21)	<0,001
IL-8 (pg/mL)	7,07 (4,87-9,27)	3,19 (1,70-5,64)	<0,001
IL-10 (pg/mL)	0,48 (0,16-0,48)	0,16 (0,03-0,48)	<0,001
IL-17 (pg/mL)	1,10 (0,88-1,76)	1,10 (0,66-1,76)	0,838
TNF- α (pg/mL)	3,18 (2,40-5,22)	2,19 (0,84-3,64)	<0,001
IFN- γ (pg/mL)	1,47 (1,34-1,61)	1,34 (1,07-1,47)	<0,001
Proteína C-reativa (mg/L)	0,87 (0,45-1,71)	0,81 (0,38-1,81)	0,453
Lipopolissacarídeos (ng/mL)	35,1 (26,7-97,9)	34,5 (24,7-55,6)	0,303

*Teste de Mann-Whitney

As faixas de referência para os marcadores inflamatórios emergentes não foram estabelecidas na literatura, embora alguns autores tenham relatado intervalos comumente encontrados em indivíduos saudáveis (33). Considerando tais valores,

as concentrações medianas encontradas em nossa amostra não alcançaram o nível mais alto do intervalo normal sugerido.

Frente aos *clusters* obtidos, foram construídos mapas de calor (*heatmaps*) estratificados por estas categorias, usando os resultados do teste Z com nível de confiança de 99% (Figura 5). O quadrante superior direito do *heatmap* refere-se às operational taxonomic units (OTUs) mais presentes nos indivíduos pertencentes ao grupo “*minor*”, enquanto que o quadrante inferior esquerdo as mais presentes no grupo “*major*”.

Observa-se que um número significativamente maior de indivíduos pertencentes ao *cluster* de menor inflamação apresentaram bactérias da família *Lachnospiraceae*, reconhecidas como produtoras de butirato. Essas bactérias têm sido relacionadas à melhor perfil de saúde por exercerem efeitos imunomoduladores pela supressão da ativação do NF- κ B, diminuindo a inflamação (MIQUEL et al., 2013; KASUBUCHI et al., 2015). Além disso, este AGCC melhora a função barreira de modo a diminuir a translocação de LPS, atenuando o estado inflamatório (CANANI et al., 2011). Ao contrário, mais indivíduos do *cluster* “*major*” apresentaram OTUs pertencentes ao filo *Proteobacteria* (gênero *Halomonas*), que contem LPS em sua superfície, reconhecidos como um potente estimulador do sistema imune (HAKANSSON e MOLIN, 2011). Ademais, bactérias previamente associadas ao DM2, pertencentes à classe *Bacilli* foram mais presentes em indivíduos deste cluster (LARSEN et al., 2010).

Análises posteriores deverão testar as associações dos hábitos alimentares com estes *clusters* fornecendo subsídios que sustentem o papel da dieta na modulação do estado inflamatório subclínico.

Em se utilizando o cluster como variável dependente em análises de regressão múltipla, a mediação pela composição da microbiota também poderá ser testada. Tal estratégia de análise encontra-se em discussão com o grupo de pesquisadores.

"major" low-grade inflammation

"minor" low-grade inflammation

Figura 5. Heatmap com abundância de bactérias em 268 indivíduos estratificados segundo o cluster de inflamação de baixo grau. Test Z (p = 0,01).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Após analisar a composição da microbiota intestinal de adventistas com diferentes hábitos alimentares e sua associação a marcadores de inflamação subclínica e de resistência à insulina, nossos achados reforçam que a alimentação influencia o perfil de risco cardiometabólico e sugerem que, pelo menos em parte, tais efeitos são mediados pela microbiota intestinal.

Nossos dados são coerentes com o papel da alimentação saudável – rica em verduras, frutas e legumes – em preservar o metabolismo energético mantendo um adequado perfil cardiometabólico. A identificação de maior abundância de bactérias produtoras de butirato (por exemplo, os gêneros *Roseburia* e *Faecalibacterium*) nos vegetarianos, associada à menor adiposidade corporal e melhores parâmetros metabólicos, é compatível com ações moduladoras sobre incretinas e reguladoras da motilidade intestinal. Consideramos possível que estes benefícios sejam decorrentes de uma colonização intestinal mais favorável, mas o delineamento deste estudo não permite assegurar relações causa-efeito.

Outros achados deste estudo são concordantes com os prévios relatos de papel deletério de dietas ricas em gorduras saturadas para o sistema cardiovascular. Os adventistas onívoros apresentaram pior perfil de risco cardiometabólico que os vegetarianos. Sugerimos que sua dieta – rica em gorduras e proteínas animais – possa promover aumento de bactérias envolvidas em mecanismos fisiopatológicos das doenças cardiometabólicas (por exemplo, as classes *Gammaproteobacteria* e *Bacilli*). Neste grupo, encontramos evidências de endotoxemia metabólica, estado pró-inflamatório e de resistência à insulina e especulamos que, no longo prazo, esta condição poderia favorecer o desenvolvimento de intolerância à glicose, hipertensão

arterial e dislipidemia, predispondo à aterosclerose. De fato, nossos achados transversais comprovam maior adiposidade corporal e anormalidades do metabolismo glico-lipídico nos onívoros.

Diferente do encontrado em outros estudos, não identificamos diferenças significativas nas proporções dos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* entre aqueles indivíduos com e sem excesso de peso. É possível que a alimentação atue primariamente sobre a composição da microbiota que, por sua vez, influenciaria o metabolismo energético e a adiposidade corporal. Para melhor entendimento da complexa relação dieta-bactérias-hospedeiro são necessárias análises taxonômicas mais aprofundadas. Nosso estudo traz elementos que apoiam esta afirmação.

Um exemplo refere-se aos achados relativos à abundância da *Akkermansia muciniphila*, que apesar de gram (-), pertencente ao filo *Verrucomicrobia*, mostrou-se associada à proteção contra intolerância à glicose. Somado às evidências da literatura, é possível sugerir que esta bactéria desempenhe importante papel protetor contra a endotoxemia metabólica que predisporia à resistência à insulina.

Ao identificarmos na nossa amostra os mesmos três enterótipos previamente descritos, podemos propor que o ecossistema intestinal não é “população-específico”. As associações encontradas com hábitos alimentares e com perfil lipídico indicam que esta abordagem por agrupamentos bacterianos pode contribuir para o entendimento e avaliação do risco cardiometabólico.

Em conclusão, o estudo de adventistas com diferentes hábitos alimentares sugere que a microbiota intestinal parece representar um elo relevante que explica as relações da alimentação humana com a predisposição a doenças cardiometabólicas. Estudos prospectivos são necessários para confirmar hipóteses

levantadas neste estudo. Intervenções dietéticas poderão auxiliar no entendimento da complexidade da relação de hábitos de vida e a microbiota intestinal, cuja composição se associa a processos fisiopatológicos de doenças frequentes nas populações, tais como as cardiometabólicas.

Existe a expectativa de que estratégias dietéticas voltadas para modificar a composição da microbiota intestinal de forma sustentada possam auxiliar na promoção de saúde das populações.

8 REFERÊNCIAS

ANGELAKIS, E. et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiology**, v.7, n.1, p. 91-109, 2012.

ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v.473, n.7346, p.174-80, 2011.

AZIZ, Q. et al. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. **Neurogastroenterology and Motility**, v.25, n.1, p.4-15, 2013.

BÄCKHED, F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.104, n. 3, p.979-84, 2007.

BARZ, L. M. et al. Probiotics as complementary treatment for metabolic disorders. **Diabetes and Metabolism Journal**, v.39, p. 291-303, 2015.

BUTLER, T. L. et al. Cohort profile: The Adventist Health Study-2 (AHS-2). **International Journal of Epidemiology**, v.37, n.2, p. 260-5, 2008.

CALDER, P. C. et al. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. **British Journal of Nutrition**, v.109, p.S1–34, 2013. Supplement 1.

CANANI, R. B. et al. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v.17, n.12, p.1519–28, 2011.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v.57, p.1470–81, 2008.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v.56, p.1761–72, 2007.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The gut microbiome as therapeutic target. **Pharmacology & Therapeutics**, v.130, n.2, p.202–12, 2011.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.6, n.8, p.1621–24, 2012.

CARICILLI, A. M. et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. **PLOS Biology**, v.9, n.12, p. e1001212, 2011. doi:10.1371/journal.pbio.1001212.

CARICILLI, A. M., SAAD, M. J. A. The role of gut microbiota on insulin resistance. **Nutrients**, v.5, n.3, p.829–51, 2013.

CARVALHO, B. M. et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v.55, n.10, p.2823–34, 2012.

DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v.505, n.7484, p.559–63, 2014.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 107, n.33, p. 14691-96, 2010.

DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Nutritional modulation of gut microbiota in the context of obesity and insulin resistance: Potential interest of prebiotics. **International Dairy Journal**, v.20, n.4, p.277-80, 2010.

DUNCAN, S. H. et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International Journal of Obesity**, v.32, n.11, p.1720–1724, 2008.

EVERARD, A. et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.110, n.22, p.9066-71, 2013.

FERROCINO, I. et al. Fecal microbiota in healthy subjects following omnivore, vegetarian and vegan diets: culturable populations and rRNA DGGE profiling. **Plos ONE**, v.10, n.6, p.e0128669, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0128669.

FINUCANE, M. M. et al. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. **PLoS ONE**, v.9, n.1, p.e84689, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0084689.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; ESPOSITO, K. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v.48, n.4, p.677-85, 2006.

HARRIS, K. et al. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? **Journal of Obesity** [Internet], 2012, ID: 879151. doi:10.1155/2012/879151.

HAKANSSON, A.; MOLIN, G. Gut microbiota and inflammation. **Nutrients**, v. 3, p.637-82, 2011.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v.6, n.1, p. 39-51, 2013.

HOLZER, P.; REICHMANN, F.; FARZI, A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. **Neuropeptides**, v.46, n.6, p. 261-74, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: Despesas, rendimentos e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

JI, Y.; SAKATA, Y.; TSO, P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.14, n.4, p. 315-21, 2011.

KAPLAN, J. L.; WALKER, W. A. Early gut colonization and subsequent obesity risk. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.15, n.3, p.278-84, 2012.

KASUBUCHI, M. et al. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. **Nutrients**, v.7, n.4, p.2839-49, 2015.

KIM, K. A. et al. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. **PLoS ONE**, v.7, n.10, p.e47713, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0047713.

KIM, M. S. et al. Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. **Environmental Microbiology Reports**, v.5, n.5, p. 765-75, 2013.

KOETH, R. A., et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. **Nature Medicine**, v.19. n.5, p.576-85, 2013.

KOLA, B. Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. **Journal of Neuroendocrinology**, v.20, p.942-51, 2008.

LANG, J. M.; EISEN, J. A.; ZIVKOVIC, A. M. The microbes we eat: abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. **PeerJ Computer Science**, v.2, p.e659, 2014. doi: 10.7717/peerj.659. eCollection 2014.

LARSEN, N. et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **PloS ONE**, v.5, n.2, p. e9085, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0009085.

LE HUËROU-LURON, I.; BLAT, S.; BOUDRY, G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. **Nutrition Research Review**, v.23, n.1, p.23-36, 2010.

LEE, C. The effect of high-fat diet-induced pathophysiological changes in the gut on obesity: what should be the ideal treatment? **Clinical and Translational Gastroenterology**, v.4, n.7, p. e39, 2013. doi:10.1038/ctg.2013.11.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.102, n.31, p.11070-5, 2005.

LIM, M. Y. et al. Stability of gut enterotypes in Korean monozygotic twins and their association with biomarkers and diet. **Scientific Reports**, v.4, p.7348, 2014. doi:10.1038/srep07348.

LISZT, K. et al. Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.54, n.4, p. 253-7, 2009.

LOPEZ-LEGARREA, P. et al. The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.23, n.3, p.360-8, 2014.

LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v.489, n.7415, p. 220-30, 2012.

MARIAT, D. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v.9, n.123, 2009. doi:10.1186/1471-2180-9-123.

MATAMOROS, S. et al. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in microbiology**, v.21, n.4, p.167-73, 2013.

MIQUEL, S. et al. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. **Current Opinion in Microbiology**, v.16, n.3, p.255–61, 2013.

MUCCIOLI, G. G. et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. **Molecular Systems Biology**, v.6, n.392, 2010. doi:10.1038/msb.2010.46.

ORLICH, M. J. et al. Vegetarian dietary patterns and mortality in Adventist Health Study 2. **JAMA Internal Medicine**, v.173, n.13, p.1230–38, 2013.

PERIS-BONDIA, F. et al. The active human gut microbiota differs from the total microbiota. **PLoS ONE**, v. 6, n.7, p. e22448, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0022448.

PETTERSEN, B. J. et al. Vegetarian diets and blood pressure among white subjects: results from the Adventist Health Study-2 (AHS-2). **Public Health Nutrition**, v.15, n.10, p.1909-16, 2012.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v.464, p.59-65, 2010.

RAYMOND, F. et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. **International Society for Microbial Ecology**, 2015. doi:10.1038/ismej.2015.148.

RIZZO, N. S. et al. Vegetarian dietary patterns are associated with a lower risk of metabolic syndrome: the Adventist health study 2. **Diabetes Care**, v.34, n.5, p. 1225-7, 2011.

ROAGER, H. M. et al. Microbial enterotypes, inferred by the Prevotella-to-Bacteroides ratio, remained stable during a 6-month randomized controlled diet intervention with the new nordic diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.3, p.1142-9, 2014.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.S1-63, 2010. Supplement 2.

RUENGSONGWONG, S. et al. Senior Thai fecal microbiota comparison between vegetarians and non-vegetarians using PCR-DGGE and real-time PCR. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.8, p.1026-33, 2014.

SAAD, M. S. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SABATÉ, J., WIEN, M. A perspective on vegetarian dietary patterns and risk of metabolic syndrome. **British Journal of Nutrition**, v.113, p.S136–S43, 2015. Supplement 2.

SEVENTH-DAY ADVENTIST CHURCH. **Yearbook**. Hagerstown: Herald Publishing Association, 2011.

SHANAHAN, F. The colonic microbiota in health and disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.29, n.1, p.49-54, 2013.

SHEN, J.; OBIN, M. S.; ZHAO, L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, v.34, n. 1, p. 39-58, 2013.

SILVA, L. B. E. et al. Prevalência de hipertensão arterial em adventistas do sétimo dia da capital e do interior paulista. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n.4, p. 329-37, 2012.

SPOR, A.; KOREN, O.; LEY, R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. **Nature Review Microbiology**, v.9, n.4, p. 279-90, 2011.

TAZOE, H. et al. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.59, p.S251-62, 2008. Supplement 2.

TEHRANI, A. B. et al. Obesity and its associated disease: a role for microbiota? **Neurogastroenterology and Motility**, v.24, n.4, p. 305-11, 2012.

TEIXEIRA, R. C. M. A. et al. Risco cardiovascular em vegetarianos e onívoros: um estudo comparativo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.89, n.4, p.237-44, 2007.

TILG, H.; KASER, A. Gut microbiome, obesity and metabolic dysfunction. **The Journal of Clinical Investigation**, v.121, n.6, p.2126-32, 2011.

TONSTAD, S et al. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.23, n.4, p.292-9, 2013.

TSUKUMO, D. M. et al. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n.2, p. 139-44, 2009.

ULVEN, T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. **Frontiers in Endocrinology**, v.3, 2012. doi: 10.3389/fendo.2012.00111.

WALSH, C. J. et al. Beneficial modulation of the gut microbiota. **FEBS Letters**, v.588, n. 22, p. 4120-30, 2014.

WONG, J. M. W. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, n.3, p. 235-43, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva, 2003 (WHO Technical Report Series, 916).

WU, G. D. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v.334, n.6052, p.105-8, 2011.

WU, G. D. et al. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. **BMC Microbiology**, v. 10, p.206, 2010. doi:10.1186/1471-2180-10-206.

ZHANG, C. et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **The ISME J**, v.4, n.2, p.232-41, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Dados de Identificação

Nome do paciente:

Identidade Nº: Sexo: () M () F

Data de nascimento:/...../.....

Endereço: Nº:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto de Pesquisa:

Análise da microbiota intestinal em adultos com padrões dietéticos distintos e de possíveis associações com o estado inflamatório, a sensibilidade à insulina e adiposidade corporal

1. Avaliação de Risco da Pesquisa

Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante. Incluem preenchimento de questionário, medidas antropométricas (peso, altura e circunferência de cintura) e de pressão arterial e coletas de sangue venoso e fezes.

A coleta de sangue será realizada no Hospital Universitário da USP, localizado na Cidade Universitária, em dia e hora pré-agendados, por profissionais experientes usando materiais descartáveis. Estas ocorrerão em apenas uma ocasião, no início da pesquisa.

Para coleta de sangue são necessárias 12 horas de jejum; raramente, a punção venosa provoca pequeno hematoma (mancha roxa) no local da punção, que, em geral, desaparecem após 3 a 5 dias.

2. Duração da Pesquisa: 8 semanas

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DA PESQUISADORA AO SUJEITO DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

O **objetivo** da pesquisa é analisar as bactérias presentes na flora intestinal de pessoas com diferentes hábitos alimentares (veganos, ovo-lacto-vegetarianos e onívoros) e graus de gordura corporal e associá-lo a exames que indicam predisposição para o diabetes e outras doenças crônicas. Esse estudo é importante por que a flora intestinal pode ser alterada segundo os hábitos alimentares e o excesso de peso. Portanto, conhecer a flora intestinal de pessoas com hábitos alimentares diferentes pode auxiliar na prevenção e controle de doenças, como o diabetes e a hipertensão. Antes de tomar uma decisão sobre sua participação neste estudo, é fundamental que leia e compreenda as explicações dos procedimentos expostos abaixo. Este termo de consentimento livre e esclarecido descreve a finalidade, os procedimentos, os benefícios, riscos, desconfortos e advertências deste estudo.

Sua participação inclui:

- a) Conceder uma amostra de fezes.
- c) Permitir a coleta de sangue por punção venosa.
- d) Permitir que alguns dados coletados pelo Advento Study sejam utilizados para essa pesquisa (peso, altura, medida da sua cintura, resultados de exames de sangue e questionários sobre sua alimentação).

IV – ESCLARECIMENTOS DOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Se tiver qualquer dúvida ou pergunta relativa ao estudo, entre em **contato** com a Profa. Dra. Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo, pelo telefone 3061-7870.

Não haverá **riscos** para a integridade física, mental ou moral da sua pessoa.

Todas as informações aqui prestadas serão de caráter confidencial e utilizadas somente para fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal. Esclarece-se que o seu consentimento está sendo pedido para a participação neste estudo, não sendo extensível a nenhum outro projeto de pesquisa. É garantida e respeitada a **privacidade** na divulgação dos resultados da pesquisa, e não haverá, de forma alguma, a sua identificação.

Qualquer provável benefício do estudo para o bem estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto, se o Sr(a) não entender alguma das questões, por favor, solicite os esclarecimentos que julgar necessários. Também a pesquisadora estará à disposição para informá-lo(a) sobre os procedimentos, riscos e benefícios decorrentes da pesquisa, ou qualquer outra dúvida sobre o estudo.

É garantido o **direito de desistir** a qualquer momento da participação nesta pesquisa, sem prejuízo algum para você. O(A) sr(a) tem a liberdade de não participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento.

V – INFORMAÇÕES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS

Você poderá entrar em contato em qualquer momento com a Dra. Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo e com a nutricionista Ana Carolina Franco.

Telefones: 3061-7870 ou pelos e-mails: sandrafv@usp.br / amoraes@usp.br

Ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FSP – COEP/FSP:

Telefones: 3061-7779 ou 3061-7742 – E-mail: coep@fsp.usp.br

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, nº 715

Bairro: Cerqueira César Cidade: São Paulo CEP: 01246-904

Ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do HU – CEP/HU:

Telefone: 3091-9457 – Fax: 3091-9452 – E-mail: cep@hu.usp.br

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária

São Paulo CEP: 05508-000

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar da presente pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)

ANEXO B – Parecer consubstanciado CEP/FSP/USP

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da microbiota intestinal em adultos com padrões dietéticos distintos e de possíveis associações com o estado inflamatório, a sensibilidade à insulina e adiposidade corporal

Pesquisador: Ana Carolina Franco

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 1

CAAE: 04675612.1.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 154.416

Data da Relatoria: 21/09/2012

Apresentação do Projeto:

A prevalência de obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tem crescido substancialmente nas últimas décadas nas diferentes regiões do globo. Nos países em desenvolvimento, os padrões de consumo alimentar sofreram intensas e rápidas modificações, principalmente em relação ao aumento do consumo de gordura saturada, sódio e carboidratos simples, acarretando crescimento acelerado do excesso de peso (IBGE, 2009). As causas da obesidade são múltiplas, envolvendo fatores genéticos, hábitos de vida e fatores biológicos diversos, no entanto, pesquisas recentes têm sugerido que as bactérias que colonizam o intestino humano desempenham papel de destaque na gênese desta e de outras doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs), como o DM2 e a aterosclerose.

A microbiota intestinal é adquirida no período pós-natal, composta por uma grande diversidade de bactérias que desempenham diferentes funções no hospedeiro humano, entre elas a proteção contra patógenos e modulação do sistema imune. O conteúdo bacteriano intestinal não é totalmente conhecido, mas se sabe que é influenciado por fatores intrínsecos e principalmente externos que modulam sua composição e função. A avaliação

desta microbiota pode permitir a utilização de diferentes estratégias com o intuito de manipular populações bacterianas e promover a saúde. Estudos recentes indicam que a microbiota intestinal de indivíduos magros e obesos difere, assim como pode variar na dependência dos padrões alimentares. Pesquisas em humanos na população brasileira são raras. Está sendo proposto um

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.245-904

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7742

E-mail: coep@fsp.usp.br

**FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

estudo transversal comparativo envolvendo indivíduos com diferentes graus de adiposidade corporal que mantêm hábitos alimentares distintos (veganos, ovo-lacto-vegetarianos e onívoros), a fim de se analisar possíveis diferenças entre as microbiotas destes grupos, relacionando-as com parâmetros inflamatórios (PCR, TNF-alfa e IL-6) e metabólicos (perfil lipídico, glicemia e insulinemia). A avaliação do perfil molecular das microbiotas será realizada em amostra fecal, utilizando-se da técnica de sequenciamento genético de 16S rRNA.

Os participantes do presente estudo constituem-se de fiéis da Igreja Adventista do Sétimo Dia que participarão do ADVENTO Study realizado no Hospital Universitário (HU) da USP. Serão convidados a participar, uma sub-amostra de 300 indivíduos, de ambos os sexos, com idade entre 35 e 60 anos, que aceitem fornecer uma amostra de fezes e coleta de sangue, adicionais às outras avaliações que serão realizadas pelo ADVENTO Study. amostra será de conveniência, devendo ser composta de três subgrupos, contendo 1/3 dos indivíduos presentes no grupo menos numeroso do ADVENTO Study (veganos, n=300). Dessa forma, cada subgrupo (veganos, ovo-lacto-vegetarianos e onívoros) deverá conter 100 indivíduos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar o perfil de bactérias presente na microbiota intestinal de grupos de indivíduos com diferentes padrões alimentares (veganos, ovo-lactovegetarianos e onívoros) e graus de adiposidade corporal e associá-lo a marcadores de estado inflamatório subclínico e resistência à insulina.

Objetivo Secundário:

-Identificar diferentes padrões alimentares de membros da Igreja Adventista do Sétimo Dia, participantes do ADVENTO Study. -Comparar a composição da microbiota intestinal de indivíduos eutróficos e com excesso de peso. -Nos subgrupos com diferentes padrões alimentares (veganos, ovo-lacto-vegetarianos e onívoros) comparar: Distribuição percentual dos filos de bactérias predominantes Variáveis antropométricas Variáveis metabólicas Índice de resistência à insulina Marcadores inflamatórios.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Há um risco mínimo para os sujeitos no presente estudo, devido à necessidade de se coletar amostra de sangue, que ocasionalmente poderá causar o aparecimento de um leve hematoma no local da punção. Além disso, poderá ocorrer um pequeno desconforto durante a avaliação antropométrica e a coleta de dados (questionários). Sendo assim, as consequências que serão

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715		
Bairro: Cerqueira Cesar		CEP: 01.246-904
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)3061-7779	Fax: (11)3061-7742	E-mail: coep@fsp.usp.br

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

ocasionadas não interferirão nas atividades físicas e/ou intelectuais de rotina.

Benefícios:

Analisar a composição da microbiota de indivíduos com diferentes padrões alimentares pode trazer subsídios para intervenções na dieta, de forma a induzir uma composição de bactérias que minimize condições pró-inflamatórias predisponentes de obesidade e DCNTs.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo bem elaborado que aborda tema relevante e está adequado em termos da Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está redigido de forma adequada. Apresenta os requisitos básicos para pesquisa com seres humanos.

Recomendações:

Sem observações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser aprovado pelo COEP/FSP/USP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 26 de Novembro de 2012

Assinador por:
Claudio Leone
(Coordenador)

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7742

E-mail: coep@fsp.usp.br

ANEXO C – Parecer consubstanciado CEP/HU/USP

São Paulo, 18 de dezembro de 2012,

Excelência,

Ana Carolina Franco

Faculdade de Saúde Pública

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Prezada Senhora

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS 196/96) e suas complementares, analisou o **Protocolo de Pesquisa** intitulado *"Análise da microbiota intestinal em adultos com padrões dietéticos distintos e de possíveis associações com o estado inflamatório, a sensibilidade à insulina e a adiposidade corporal"* - **Pesquisador(a) responsável:** Ana Carolina Franco – **Equipe de Pesquisa:** Sandra Roberta Gouvêa Ferreira Vivolo - **Registro CEP-HU/USP:** 1226/12 – **CAAE:** 04675612.1.0000.5421, considerando-o como **APROVADO "AD REFERENDUM"**.

Portanto, a Pesquisa poderá ser iniciada a partir desta data, devendo o Protocolo ser apresentado na próxima reunião do Comitê marcada para o dia 01 de fevereiro de 2013, para homologação desta aprovação.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

CURRÍCULO LATTES

AUTOR

Ana Carolina Franco de Moraes

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1803499385486756>

Última atualização do currículo em 02/03/2015

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Nutrição pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (2002) e mestrado em Enfermagem pela Universidade Estadual de Campinas (2006). Atualmente é doutoranda em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública/USP. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em distúrbios metabólicos, atuando principalmente nos seguintes temas: dislipidemia, resistência à insulina, obesidade e microbiota intestinal.

(Texto informado pelo autor)

Links para Outras Bases:

[SciELO - Artigos em texto completo](#)

Dados pessoais

Nome Ana Carolina Franco de Moraes
Nascimento 25/04/1981 - Presidente Prudente/SP - Brasil
CPF 286.360.468-02

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Nutrição em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Análise da microbiota intestinal em adultos com padrões dietéticos distintos e de possíveis associações com o estado inflamatório, a sensibilidade à insulina e adiposidade corporal
Orientador: Sandra Roberta Gouveia Ferreira Vivolo
Co-orientador: Bianca de Almeida Pinto
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2004 - 2008** Mestrado em Enfermagem.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: Educação Nutricional na formação do nutricionista: bases teóricas e relação teoria-prática, Ano de obtenção: 2006
Orientador: Maria Cristina Faber Boog
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1999 - 2002** Graduação em Nutrição.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Campinas, Brasil

Formação complementar

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Metagenômica Bioinformática.
European Bioinformatics Institute, EMBL, Hinxton, Inglaterra
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Microbiota intestinal vs resistência à insulina.
IBS Aprimoramentos, IBS, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Fitoterapia aplicada à nutrição.
Evidence Nutri, EVIDENCE NUTRI, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Fitoterapia para nutricionistas.
Racine, RACINE, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Manejo e Promoção do Aleitamento Materno.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Campinas, Brasil
- 2003 - 2003** Extensão universitária em Uso e Aplicações do Sistema Espirito.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Campinas, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Nutrição e Estética.
Encontro Nacional de Atividade Física, ENAF, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Nutrição Clínica Funcional da Teoria à Prática.
Encontro Nacional de Atividade Física, ENAF, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Nutrição na Atividade Física.
Encontro Nacional de Atividade Física, ENAF, Brasil
- 2000 - 2000** Curso de curta duração em Nutrição e Metabolismo na Infância e Adolescência.
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU

Vínculo
Institucional

- 2012 - 2013** Vínculo: Celista, Enquadramento funcional: Professor assistente, Carga horária: 15, Regime: Parcial

ORIENTADOR

 Imprimir
currículo

Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo

 Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6633883139386618>

Última atualização do currículo em 04/11/2015

Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq - Nível 1B

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (1981), mestrado em Medicina (Endocrinologia Clínica) pela Universidade Federal de São Paulo (1986) e doutorado em Medicina (Endocrinologia Clínica) pela Universidade Federal de São Paulo (1988). Atualmente é consultor médico e científico da Associação de Diabetes Juvenil, consultor médico e científico da Federação Nacional das Associações de Diabéticos, consultor ad hoc do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, professor titular da Universidade de São Paulo, diretora-secretária da Sociedade Brasileira de Diabetes, diretora-secretária da Associação Brasileira de Exercício, Esporte e Diabetes -DESA Brasil e consultor ad hoc da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em Medicina, atuando principalmente nos seguintes temas: diabetes mellitus, nipo-brasileiros, diabetes, hipertensão arterial e obesidade.

(Texto informado pelo autor)

Links para Outras Bases:

[SciELO - Artigos em texto completo](#)

Dados pessoais

Nome Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo

Nascimento 09/06/1958 - Campinas/SP - Brasil

CPF 025.056.668-06

Formação acadêmica/titulação

- 1986 - 1988** Doutorado em Medicina (Endocrinologia Clínica).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil
Título: BLOQUEIO DOPAMINERGICO PERIFÉRICO COM DOMPERIDONE NO TRATAMENTO DA HIPOTENSÃO ORTOSTÁTICA DA NEUROPATIA DIABÉTICA., Ano de obtenção: 1988
Orientador: MARIA TEREZA ZANELLA
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1984 - 1986** Mestrado em Medicina (Endocrinologia Clínica).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil
Título: ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS TESTES DE DILUIÇÃO RENAL NA SÍNDROME DE BARTTER., Ano de obtenção: 1986
Orientador: CLAUDIO ELIAS KATER
- 1982 - 1983** Especialização em Clínica Médica.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Campinas, Brasil
Título: Residência em Clínica Médica
- 1976 - 1981** Graduação em Medicina.
Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Campinas, Brasil
Título: Médica

Pós-doutorado e livre-docência

- 1988 - 1989** Pós-Doutorado .
University of London, U.L., Londres, Inglaterra
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1997** Livre Docência .
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil
Título: Hipertensão Arterial em Nipo-Brasileiros de 1a. e 2a. Gerações: Prevalência e sua Relação com a Síndrome da Resistência à Insulina., Ano de obtenção: 1997

Formação complementar

CO-ORIENTADOR

Bianca de Almeida Pititto Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8433952854107690>

Última atualização do currículo em 27/09/2015

Resumo informado pelo autor

Possui formação em Clínica Médica, mestrado em estudo sobre fatores de risco cardiovascular pela Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP (2003) e doutorado em intervenção para prevenção de diabetes mellitus e impacto em fatores de risco cardiovascular pela Faculdade de Saúde Pública-USP (2009), tendo sido "visiting student" no MRC Epidemiology Unit of Cambridge University-UK (2007). Finalizou pós-doutorado pela Faculdade de Saúde Pública - USP, estudando fatores de risco cardiovascular não tradicionais em coorte de estudo epidemiológico, ELISA-SP, em agosto de 2013. É médica concursada do Departamento de Medicina Preventiva-UNIFESP, atuando na área de doenças crônicas não transmissíveis e fatores de risco cardiometabólicos (dislipidemia, hipertensão, obesidade). Curso de pós-graduação Lato Sensu em Geriatria na UNIFESP. Áreas de atuação: das doenças crônicas não transmissíveis (obesidade, diabetes, dislipidemia e hipertensão), fatores de risco cardiovascular tradicionais e não tradicionais, prevenção nos diversos níveis de diabetes e doença cardiovascular, origem desenvolvimentista da saúde e da doença (Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD), epidemiologia.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome: Bianca de Almeida Pititto

Nascimento: 22/12/1973 - Brasil

CPF: 037.824.187-78

Formação acadêmica/titulação

- 2007 - 2009** Doutorado em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Efeitos de um Programa de Intervenção no Estilo de Vida sobre Perfil Cardiometabólico de População Hipo-brasileira de Alto Risco Cardiovascular. Ano de obtenção: 2009
Orientador: Sandra Roberta Gouveia Ferreira Viçolo
- 2001 - 2003** Mestrado em Medicina (Endocrinologia Clínica).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil
Título: Lipídeos e Síndrome Metabólica: um estudo populacional em migrantes japoneses. Ano de obtenção: 2003
Orientador: Sandra Roberta G. Ferreira
- 2006 - 2008** Especialização em Geriatria e Gerontologia.
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil
Título: Diabetes e alteração cognitiva
Orientador: Mayssa Cendorogio
- 1998 - 2001** Especialização - Residência médica.
Faculdade de Medicina de Jundiaí, FMJ, Jundiaí, Brasil
Título: Clínica médica
Orientador: 0159138803
- 2007 - 2007** Aperfeiçoamento em MRC Epidemiology Unit.
University of Cambridge, CAM, Cambridge, Inglaterra
Título: Impact of one year of behavioural intervention in a high cardiovascular risk population.
Orientador: Sandra RG Ferreira / Simon Griffin

Pós-doutorado

- 2010 - 2013** Pós-Doutorado.
Faculdade de Saúde Pública, USP, FSP-USP, Brasil
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Atuação profissional

1. Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Vínculo Institucional

2004 - Atual Vínculo: médica, Enquadramento funcional: Médica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

- 01/2004 - Atual** Outra atividade técnico-científica, Departamento de Medicina Preventiva
Especialização:
Médica clínica/Ensino para 2º e 5º ano de Medicina/Preceptoria em obesidade e diabetes para residentes de Medicina de Família

2. Universidade de São Paulo - USP