

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Raquel de Almeida Torga Rodrigues

**MAPEAMENTO DO MICROBIOMA INTESTINAL DE BRASILEIROS SADIOS
PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO *SHALLOW SHOTGUN***

Belo Horizonte

2023

Raquel de Almeida Torga Rodrigues

**MAPEAMENTO DO MICROBIOMA INTESTINAL DE BRASILEIROS SADIOS
PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO *SHALLOW SHOTGUN***

Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Garcia Vilela

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz
Coelho

Belo Horizonte

2023

R696m Rodrigues, Raquel de Almeida Torga.
Mapeamento do microbioma intestinal de brasileiros saudáveis pela técnica de sequenciamento genético *Shallow Shotgun* [recursos eletrônicos]. / Raquel de Almeida Torga Rodrigues. -- Belo Horizonte: 2023.
76 f.: il
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Garcia Vilela.
Coorientador (a): Luiz Gonzaga Vaz Coelho.
Área de concentração: Clínica Médica.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Microbioma Gastrointestinal. 2. Sequência de Bases. 3. Marcadores Genéticos. 4. Avaliação Nutricional. 5. Dissertação Acadêmica. I. Vilela, Eduardo Garcia. II. Coelho, Luiz Gonzaga Vaz. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 100



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAPEAMENTO POR SHALLOW SHOTGUN DO MICROBIOMA INTESTINAL DE BRASILEIROS SADIOS

RAQUEL DE ALMEIDA TORGA RODRIGUES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia dezenove de maio de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Eduardo Garcia Vilela - Orientador
UFMG

Luiz Gonzaga Vaz Coelho - Coorientador
UFMG

Maria do Carmo Friche
UFMG

Rogério Saad Hossne
UNESP

Belo Horizonte, 19 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Gonzaga Vaz Coelho, Membro de comissão**, em 24/05/2023, às 10:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria do Carmo Friche Passos, Membro de comitê**, em 24/05/2023, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Garcia Vilela, Professor do Magistério Superior**, em 03/07/2023, às 09:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rogério Saad Hossne, Usuário Externo**, em 19/07/2023, às 18:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2236374** e o código CRC **BD0D33ED**.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Garcia Vilela, por quem tenho profundo respeito, gratidão e admiração, pela oportunidade de realizar esse trabalho e por todos os ensinamentos durante as residências de Clínica Médica e Gastroenterologia e na pós-graduação. Ao meu coorientador, professor Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho, pela disponibilidade de participar desse projeto e contribuir de forma tão significativa para o meu aprendizado e crescimento científico.

Aos membros da banca, professores dr. Rogério Saad Hossne, dr. Rodrigo Otávio Silva e dra. Maria do Carmo Frische Passos, pela leitura atenta e criteriosa da minha dissertação e por todos os comentários e sugestões que contribuíram sobremaneira para a qualidade do trabalho final.

Aos colegas e professores das disciplinas de pós-graduação, pelo conhecimento e experiência compartilhados. Às nutricionistas Bárbara Chaves Santos e Lucilene Rezende Anastácio por engrandecerem o projeto, por meio da avaliação nutricional detalhada dos participantes, além do apoio na análise dos dados. Aos participantes do projeto, pela disponibilidade em participar de todas as etapas.

Aos meus amigos, pela paciência, carinho e palavras de apoio durante todo o mestrado. À minha família, em especial, meus pais e irmã, pelo incentivo, torcida, confiança e amor de sempre e por sempre estarem por perto nos momentos importantes. Ao meu marido, pelo amor e auxílio durante todo o processo.

RESUMO

O entendimento sobre as características de microbiomas saudáveis é o primeiro passo para a identificação de possíveis marcadores associados ao desenvolvimento de doença. Este estudo teve como objetivo realizar o mapeamento do microbioma intestinal em uma amostra de indivíduos brasileiros saudáveis, por meio da técnica de sequenciamento genético de alto rendimento *shallow shotgun*, além de comparar a composição taxonômica com a do produto RBX2660, suspensão de microbiota fecal obtida a partir da doação de americanos saudáveis. Os participantes foram avaliados quanto a hábitos de vida e dados do histórico médico, além de avaliação dietética e nutricional. Por meio da análise taxonômica, foi evidenciado que a microbiota intestinal era composta por cinco filos - *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* -, com predomínio da classe *Clostridia*, da família *Lachnospiraceae* e do gênero *Blautia*. A comparação com o RBX2660 evidenciou composição semelhante, com diferença apenas na classe predominante: *Clostridia* na amostra brasileira e *Bacteriodia* no produto. Na avaliação dietética e nutricional, foi observado percentual significativo do consumo energético total proveniente de alimentos processados ou ultraprocessados e ingestão deficitária de fibras.

Palavras-chave: microbioma intestinal; sequenciamento gênico; *shallow shotgun*; saudável; avaliação nutricional.

ABSTRACT

Understanding the characteristics of healthy microbiomes is the first step towards identifying possible markers associated with the development of disease. This study aimed to map the intestinal microbiome in a sample of healthy Brazilian individuals, using the shallow shotgun high-throughput genetic sequencing technique, in addition to comparing the taxonomic composition with that of the product RBX2660, a fecal microbiota suspension obtained from the donation of healthy Americans. Participants were evaluated regarding lifestyle and medical history data, in addition to dietary and nutritional assessment. Through taxonomic analysis, it was shown that the intestinal microbiota was composed of five phyla - *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia* -, with a predominance of the Clostridia class, the *Lachnospiraceae* family and the *Blautia* genus. Comparison with RBX2660 showed a similar composition, with difference only in the predominant class: *Clostridia* in the Brazilian sample and *Bacteriodia* in the product. In the dietary and nutritional assessment, a significant percentage of total energy intake from processed or ultra-processed foods and a deficient fiber intake were observed.

Keywords: gut microbiome; gene sequencing; shallow shotgun; healthy; nutritional assessment.

LISTA DE SIGLAS

FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridização <i>in situ</i> de fluorescência
FODMAPs	Oligossacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos e polióis fermentáveis
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HEI	<i>Healthy Eating Index</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMP	<i>Human Microbiome Health</i>
IBP	Inibidores de bombas de prótons
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
IQD-R	Índice de Qualidade de Dieta Revisado
MetaHIT	<i>Metagenomes of the Human Intestinal Tract</i>
MHI	<i>Microbiome Health Index</i>
NEPA	Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação
ONU	Organização das Nações Unidas
OTU	Unidades taxonômicas operacionais
TACO	Tabela Brasileira de Composição de alimentos - NEPA e UNICAMP
TBCA	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - Brazilfoods e USP
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade de São Paulo
VCT	Valor calórico total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	19
3 JUSTIFICATIVA.....	20
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1 Aspectos éticos.....	26
5.2 Participantes.....	26
5.2.1 Critérios de exclusão.....	26
5.3 Métodos.....	27
5.3.1 Entrevista de triagem e aplicação de questionário.....	27
5.3.2 Coleta de amostras de sangue para exclusão de infecções virais e gestação.....	28
5.3.3 Coleta e armazenamento de fezes.....	28
5.3.4 Avaliação dietética e nutricional.....	28
5.3.5 Análise de amostras fecais.....	32
5.3.6 Análises estatísticas.....	33
5.3.7 Avaliação de disbiose intestinal.....	33
5.3.8 Avaliação de diversidade microbiana.....	34
6 RESULTADOS.....	35
6.1 Participantes.....	35
6.2 Avaliação dietética e nutricional.....	36
6.3 Perfil de microbioma intestinal de indivíduos brasileiros saudáveis.....	37
6.4 Comparação da coorte brasileira com o produto RBX2660.....	42
7 DISCUSSÃO.....	44
8 CONCLUSÃO.....	52
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	68
APÊNDICE B - Questionário de hábitos de vida e histórico médico.....	70

APÊNDICE C - Banco de dados completos de avaliação dietética.....	72
APÊNDICE D - Banco de dados completos de avaliação dietética (micronutrientes).....	74

1 INTRODUÇÃO

O corpo humano é habitado por um conjunto de microrganismos vivos constituído por bactérias, fungos, vírus, protozoários e, arqueias, denominado microbiota^{1,2}. O termo microbioma refere-se aos microrganismos de um determinado habitat e aos genes que constituem seu genoma (metagenoma)¹. Assim como as células microbianas, principalmente bacterianas, superam em número as células do próprio indivíduo, o metagenoma possui uma variedade genética que ultrapassa numericamente o genoma humano^{3,4}. O trato gastrointestinal abriga grande parte desses microrganismos, predominantemente na porção distal do intestino delgado e no intestino grosso, constituindo o microbioma intestinal^{2,3}.

De maneira geral, o microbioma intestinal é o mais amplamente estudado devido às elevadas densidade e variedade de espécies microbianas que o compõe⁵. A baixa densidade microbiana de alguns sítios, como pulmão, leite materno e placenta, limita o rendimento do sequenciamento gênico das amostras desses sítios, o que dificulta a caracterização de constituintes do microbioma saudável⁵. No intestino, mais de mil espécies bacterianas foram identificadas, com predomínio de dois filos: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, com grande variação na razão *Firmicutes/Bacteroidetes* entre diferentes indivíduos⁵.

A diversidade microbiana é definida pela variedade e abundância relativa de diferentes tipos de microrganismos⁶. A elevada diversidade é uma característica de microbiomas saudáveis, fundamental para o exercício de suas funções no organismo humano, para a resistência frente a agentes estressores e para a resiliência - capacidade de se restaurar a partir de uma modificação composicional ou funcional, definida como disbiose^{1,5}. A diversidade é subdividida em alfa, relativa a amostras de um mesmo habitat; beta, referente a amostras de habitats distintos; e gama, englobando todos os habitats de um dado indivíduo⁶. Há grande diversidade microbiana entre diferentes indivíduos⁶. Contudo, há maior semelhança comparando-se o mesmo habitat em diferentes indivíduos do que comparando-se diferentes habitats em um mesmo indivíduo⁶.

O microbioma intestinal começa a se estabelecer ao nascimento e, ao longo da vida, sofre significativas modificações composicionais e funcionais⁷. Os fatores genéticos exercem um papel central à medida que influenciam o sistema imune, a

arquitetura intestinal e a susceptibilidade a doenças, como a obesidade⁸. Estudos de genotipagem evidenciaram relações entre variantes genéticas humanas e o microbioma intestinal, por meio de ação na imunidade inata e adaptativa, além de alteração de integridade da barreira intestinal^{8,9}. Como exemplo, as mutações no gene NOD2 foram identificadas como fator de risco para o desenvolvimento de doença inflamatória intestinal¹⁰.

Fatores presentes ao nascimento e nos primeiros anos de vida podem influenciar na composição de um microbioma saudável na fase adulta⁵. Em prematuros, difere-se de nascidos a termo, provavelmente devido à ação de fatores ambientais, como uso de antimicrobianos, internação hospitalar e, eventualmente, alimentação enteral, além da imaturidade orgânica⁸. Há menor diversidade e maior colonização por espécies potencialmente patogênicas da família *Enterobacteriaceae* do filo *Proteobacteria*, além da redução de anaeróbios estritos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides*⁹.

A via de parto também influencia na composição do microbioma intestinal¹⁰. Ao nascimento, o intestino é estéril⁷. O microbioma se estabelece a partir do contato com o ambiente e com o microbioma materno, seja por meio da pele, vagina e/ou do conteúdo fecal^{10,11}. Durante o parto vaginal, o recém-nascido adquire um microbioma semelhante ao vaginal materno, com predomínio de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, além de anaeróbios facultativos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Bacteroides fragilis* e *Streptococcus* sp.^{5,10,11}. Enquanto na cesariana, o microbioma intestinal é menos diversificado, proveniente do ambiente hospitalar e da pele materna, predominando *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Propionibacterium* sp., em detrimento de *Escherichia coli*, *Shigella* sp. e *Bacteroides* sp.^{5,10}. Há ainda maior colonização por patógenos oportunistas, como *Haemophilus* sp., *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter hormaechei*, *Veillonella dispar* e *Veillonella parvula*^{5,10}. Essas diferenças podem explicar a associação entre cesariana e risco aumentado de obesidade e afecções crônicas de ordem imunológica, tais como asma, doenças do tecido conjuntivo e doença inflamatória intestinal¹²⁻¹⁶.

A diversidade do microbioma intestinal aumenta com a idade: aos três anos de idade, o microbioma já apresenta composição e diversidade semelhantes a de adultos, caracterizado pelo predomínio de três filios: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*^{2,17,18}. Ao contrário de adolescentes e crianças, o microbioma de adultos

é mais estável e sua composição é influenciada principalmente por fatores ambientais quando comparado a fatores genéticos¹⁸. O envelhecimento é associado à redução de diversidade microbiana, devido a alterações na digestão e absorção de alimentos, mudanças de hábitos dietéticos e menor ativação do sistema imune^{2,11}. Observa-se redução de anaeróbios, como *Bifidobacterium* sp. e aumento de bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria* e ao gênero *Clostridium*⁵.

Ao longo de toda a vida, os hábitos dietéticos constituem-se um dos principais fatores ambientais associados à variação intra e interindividual da composição microbiana⁵. A amamentação, por exemplo, está associada ao desenvolvimento de um microbioma intestinal mais saudável, devido à lactoferrina e aos oligossacarídeos presentes no leite humano que favorecem a colonização por espécies de *Bifidobacterium* sp. e *Bacteroides* sp., uma vez que utilizam esses carboidratos como única fonte de carbono^{5,18,19}. A presença de simbioses, como dos gêneros *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de *Faecalibacterium prausnitzii*, nos primeiros anos de vida, favorece o desenvolvimento de um microbioma saudável, por meio da síntese de ácidos graxos de cadeia curta que têm ação imunomoduladora, inibem o crescimento de patógenos e possivelmente possuem propriedades supressoras de tumor^{5,20}. O uso de fórmulas para nutrição infantil foi associado à maior colonização por *Escherichia coli* e *Clostridioides difficile*, além de menor diversidade microbiana quando comparado ao aleitamento materno¹⁹. A interrupção do aleitamento e a introdução de alimentos sólidos determinam grandes alterações do microbioma, quando passam a predominar *Bifidobacterium* sp., *Clostridium coccooides* e *Bacteroides* sp.⁹.

Estudos de curta duração realizados com dietas restritivas evidenciaram alterações rápidas e reprodutíveis sobre a composição microbiana^{17,21}. Um estudo avaliou o efeito do consumo de dieta à base de vegetais ou de proteína animal durante cinco dias consecutivos²¹. A dieta à base de vegetais, com grande quantidade de fibras e baixo teor de gorduras e proteínas, foi associada a um aumento do gênero *Prevotella* e do filo *Firmicutes* que metabolizam polissacarídeos vegetais - *Roseburia* sp., *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*²¹. Já a dieta à base de proteína animal foi associada ao aumento de microrganismos tolerantes à bile do filo *Bacteroidetes* - *Alistipes* sp., *Bilophila* sp. e *Bacteroides* sp., com predomínio deste²¹. Entretanto, o efeito foi transitório, com duração de poucos dias a semanas²¹. Contudo, quando avaliadas populações em diferentes pontos geográficos, os hábitos

alimentares estão associados à composição do microbioma, sugerindo que padrões dietéticos a longo prazo podem promover alterações persistentes^{5,22}. Existem, ainda, questionamentos acerca do tema, pois os estudos apresentam heterogeneidade metodológica, os resultados não são padronizados e faltam dados literários com registros alimentares a longo prazo²². Também não se sabe por quanto tempo ou com qual frequência as alterações dietéticas devem ser realizadas para alcançar um efeito duradouro, com potenciais implicações ao hospedeiro²².

Além da dieta, o microbioma sofre influências de outros fatores ambientais, como estilo de vida e uso de medicamentos^{7,17}. A prática de exercício físico diária é associada a aumento da diversidade microbiana, com predomínio de *Firmicutes* que, por meio da produção de ácidos graxos de cadeia curta, apresentam potencial de atuar favoravelmente na integridade da barreira gastrointestinal e inibir a produção de citocinas inflamatórias^{17,26}. A obesidade e as doenças relacionadas também estão associadas a alterações do microbioma²⁷. Estudos com modelos animais evidenciaram aumento da razão *Firmicutes-Bacteroidetes*^{28,29}. Esses achados foram confirmados em estudos subsequentes que evidenciaram ainda redução da diversidade microbiana, além de menor abundância relativa média de microrganismos associados negativamente com obesidade, como a arquea metanogênica *Methanobrevibacter smithii* e a bactéria *Akkermansia muciniphila*, representante do filo *Verrucomicrobia*^{27,30-36}.

O tabagismo é outro fator relacionado ao estilo de vida que influencia o microbioma intestinal do indivíduo, com potencial papel no desenvolvimento de doenças associadas a este hábito^{17,37}. A grande diversidade de bactérias presente no cigarro, variando de microrganismos do solo e comensais a potenciais patógenos humanos, incluindo os gêneros *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Clostridium* e *Klebsiella*, além de *Pseudomonas aeruginosa*, pode favorecer a colonização dos hospedeiros, com consequente aumento do risco de pneumonia, meningite, endocardite e bacteremia^{38,39}. Além disso, o tabaco aumenta a susceptibilidade a infecções, por meio de efeito imunossupressor e favorecimento à formação de biofilme e aderência a células do hospedeiro³⁷.

Em relação aos medicamentos, a associação entre os antimicrobianos e o microbioma é a mais estudada, sendo o impacto de seu uso determinado por características, como classe, dose, tempo de uso, farmacodinâmica e espectro de ação^{40,41}. Redução de diversidade microbiana, menor abundância de *Bifidobacterium*

sp. e maior risco de colonização por cepas resistentes a antimicrobianos foram associados ao uso dessas drogas, com efeito podendo se estender por dias a anos⁴⁰. A infecção por *Clostridioides difficile* é um exemplo de doença associada à disbiose secundária ao uso de antimicrobianos, representando potencial gravidade ao hospedeiro⁴⁰.

O uso crônico de inibidores de bombas de prótons (IBP) tem sido associado à modificação do microbioma em todo o trato gastrointestinal, com redução de diversidade, aumento de bactérias provenientes da microbiota oral e maior abundância da classe *Gammaproteobacteria* e dos gêneros *Enterococcus* e *Veillonella*, em detrimento da família *Ruminococcoceae* e do gênero *Bifidobacterium*⁴¹⁻⁴³. Os IBP ainda tem sido relacionados ao aumento do risco de infecção intestinal por *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. e *Clostridioides difficile*⁴³⁻⁴⁶. A hipocloridria gástrica tem sido associada à sobrevivência e migração de bactérias potencialmente patogênicas para o intestino com consequente ativação de vias pró-inflamatórias^{42,43}.

O antiadiabético oral metformina também está associado a alterações de composição do microbioma que podem contribuir para seu efeito hipoglicemiante⁴⁷. Nos usuários do medicamento, verificou-se aumento de abundância da espécie *Akkermansia muciniphila*, que exerce fator protetor contra obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares^{41,47}. Essa bactéria atua na manutenção da integridade da mucosa, reduzindo a migração de lipopolissacarídeos pró-inflamatórios e melhorando a glicemia⁴⁷. Os imunossupressores foram associados a mudanças no microbioma, principalmente em modelos animais⁴⁸. Alterações na barreira intestinal identificadas em indivíduos em uso desses medicamentos, como redução na secreção de muco, aumento da permeabilidade intestinal e resposta imunológica não apropriada, podem ser relevantes no desenvolvimento de efeitos adversos e na colonização por microrganismos patogênicos⁴⁹.

A localização geográfica também está estabelecida como uma das principais causas de variação interindividual no microbioma, potencialmente influenciada pela combinação de fatores genéticos e ambientais⁵. Na África, foram encontrados elevados níveis de *Prevotella* sp. e redução dos gêneros *Shigella* e *Escherichia* em crianças⁵⁰. No continente Europeu, há variações entre norte e sul, com maior proporção de *Bifidobacterium* sp. no norte, enquanto, no sul, predominam *Bacteroides* sp. e *Lactobacilli* sp.⁵¹.

Além da variabilidade interpessoal e em um mesmo indivíduo ao longo do tempo, há ainda, em menor escala, variabilidade nos diversos segmentos do trato gastrointestinal⁵². O microbioma intestinal tem sido estudado a partir de amostras fecais, que são representativas do intestino grosso, mas apresentam diferenças em relação à composição do intestino delgado^{52,53}. Há grande dificuldade em se obter amostras representativas de outras regiões do trato gastrointestinal, limitando a análise de sua composição microbiana^{54,55}. O desenvolvimento de novas tecnologias, como o uso de cápsulas e cateteres para obtenção de amostras, além das amostras provenientes de ileostomia, permitiu o avanço de novos conhecimentos^{18,54}.

O microbioma intestinal é provavelmente formado a partir de microrganismos deglutidos dos microbiomas oral e salivar, sob a interferência de fatores, como acidez gástrica, ação de ácidos biliares e enzimas digestivas, produção de peptídeos antimicrobianos e motilidade gastrointestinal^{52,54,55}. Estudo utilizando amostras duodenais de 250 pacientes obtidas por endoscopia evidenciou que cerca de 90% dos microrganismos identificados também estão presentes em amostras de saliva, reforçando a hipótese da relação oral-intestinal⁵⁴.

O intestino delgado possui a maior área de superfície do organismo humano, cerca de cem vezes maior do que o intestino grosso e é responsável pela digestão e absorção de carboidratos, proteínas e lipídios⁵⁴. A presença de camada de muco mais fina e difusa permite maior interação entre o microbioma e o hospedeiro, determinante na resposta imune a microrganismos comensais e patogênicos, por meio das células dendríticas da lâmina própria e placas de Peyer^{52,54,56}. A quantidade total de microrganismos no intestino delgado é menor quando comparada ao intestino grosso, devido ao curto tempo de trânsito intestinal e às altas concentrações de bile e ácido clorídrico, notadamente nas suas porções iniciais⁵². No duodeno e jejuno, há predomínio de comensais anaeróbios facultativos favorecidos pelo metabolismo de açúcares simples e aminoácidos, como espécies dos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* e da ordem dos *Lactobacillales*^{18,52}. À medida que se aproxima do intestino grosso, há um aumento quantitativo progressivo do microbioma¹⁸. O íleo terminal, portador de camada de muco mais espessa, apresenta composição semelhante à do intestino grosso, colonizado por leveduras e anaeróbios, incluindo espécies das famílias *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Bacteroidaceae*^{18,52}.

No intestino grosso, o tempo intestinal mais lento e o pH neutro a levemente ácido favorecem a colonização⁵². Há predomínio de anaeróbicos, principalmente representantes do filo *Bacteroidetes* e das famílias *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* do filo *Firmicutes* e, em menor número, espécies dos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia* (*Akkermansia*), com pouca variação entre cólons ascendente e descendente^{18,52}. A espessa camada de muco colônico favorece a diversidade da composição microbiana do lúmen até a mucosa⁵⁷. A camada mais externa é colonizada por microrganismos que se utilizam dos nutrientes da dieta, como das famílias *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* do filo *Firmicutes* e *Bacteroidia* do filo *Bacteroidetes*^{52,57}. Na camada mais interna, encontram-se espécies que utilizam a mucina como fonte de energia dos gêneros *Akkermansia* e *Ruminococcus*, além de algumas espécies de *Bacteroides* sp.⁵².

O microbioma intestinal codifica milhares de enzimas e metabólitos microbianos, chamados em conjunto de metaboloma, por meio do qual o microbioma exerce diversas funções no organismo humano, desempenhando papel fundamental na saúde e na doença^{1,17,58}. Os microrganismos auxiliam na digestão, obtenção e absorção de nutrientes da dieta e síntese de vitaminas, alterando, dessa forma, o valor nutritivo e energético dos alimentos^{17,59,60}. Também intervém na deposição de gordura corporal, com conseqüente impacto no risco de desnutrição e obesidade^{30,59}. A interação do microbioma com xenobióticos interfere na eliminação de toxinas exógenas e na biodisponibilidade de fármacos; no perfil lipídico, por meio do metabolismo de sais biliares; na formação de cálculos renais, por meio do metabolismo de oxalato de cálcio; e na suscetibilidade de um hospedeiro a várias neoplasias, por meio da interação com carcinógenos⁵². Um microbioma saudável é fundamental para o desenvolvimento, homeostase e funcionamento adequado do sistema imunológico, com potencial de atenuar ou evitar a ocorrência de doenças tais como a asma, as neoplasias e as afecções autoimunes e de alterar a suscetibilidade à colonização por enteropatógenos^{13,14,16,17,61}.

O microbioma intestinal é crucial para evitar a colonização por microrganismos patogênicos¹⁷. A interação com o sistema imune do hospedeiro garante a integridade da barreira gastrointestinal, por meio do efeito na capacidade de renovação de células epiteliais intestinais e sua vascularização, além de regulação de funções endócrinas intestinais⁷. O microbioma também inibe a proliferação de patógenos, por meio de

competição por nutrientes, modificação do pH, secreção de peptídeos antimicrobianos e ativação do sistema imune^{12,17}.

Devido à ampla possibilidade de atuações microbianas no organismo humano, o microbioma tem sido alvo de pesquisas sobre diversas doenças crônicas, incluindo câncer, doenças inflamatórias, metabólicas, cardiovasculares, autoimunes, neurológicas e psiquiátricas⁶². A relevância dessas ações microbianas para a saúde humana, provavelmente, é variável entre indivíduos⁶². O desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de DNA de alto rendimento e o avanço da bioinformática estão possibilitando a análise de amostras de forma mais eficiente e com menor custo, favorecendo a expansão de estudos sobre o tema².

Contudo, os estudos de microbioma saudável ainda são focados em bactérias, devido à limitação de métodos moleculares para a identificação de representantes do domínio *Archaea*, vírus e eucariotos⁵. Em relação ao domínio *Archaea*, as espécies do gênero *Methanobrevibacter* são as mais prevalentes, com destaque para *Methanobrevibacter smithii*, que tem como função otimizar a digestão de polissacarídeos da dieta por outros microrganismos, alterando sua expressão gênica na presença de bactérias intestinais, como *Bacteroides thetaiotaomicron*^{3,5}.

O viroma humano é constituído principalmente por vírus que infectam bactérias, os bacteriófagos (fagos)^{5,63}. Há predomínio da ordem *Caudovirales*, compreendendo as famílias *Siphoviridae*, *Podoviridae* e *Myoviridae*⁶⁴. Existem evidências do papel dos fagos intestinais em doenças, como doença inflamatória intestinal, câncer colorretal, diabetes tipo 1 e artrite reumatoide^{63,65}.

Os eucariotos identificados em humanos são, em geral, patógenos, mas existem representantes constituintes do microbioma saudável, interagindo para contribuir com o equilíbrio imunológico microbiano^{5,66,67}. Há a hipótese de que eucariotos multicelulares, como os helmintos, constituíram o microbioma intestinal durante a evolução, mas foram eliminados durante o desenvolvimento, com potencial prejuízo de imunomodulação e interação com outros microrganismos^{5,68}.

Com relação ao microbioma fúngico, estima-se que existam 10^5 – 10^6 células fúngicas por grama de fezes, interagindo com os outros componentes do microbioma via mutualismo, comensalismo ou competição⁶⁹. Os principais filos de fungos são *Ascomycota* e *Basidiomycota*, com predomínio dos gêneros *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Candida*, *Penicillium* e *Aspergillus*⁶⁹. Os fungos induzem a resposta imune do hospedeiro, ativando receptores expressos em várias células imunes,

seguido pela liberação de moléculas antimicrobianas⁷⁰. Estudos recentes têm demonstrado o papel da microbiota intestinal em diferentes doenças, incluindo diabetes tipo II, câncer colorretal e doença inflamatória intestinal^{61,70,71}.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Mapear o microbioma intestinal em amostra de indivíduos brasileiros saudáveis, por meio da técnica de sequenciamento genético de alto rendimento *shallow shotgun*.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Analisar a diversidade de microrganismos constituintes do microbioma intestinal;
2. Comparar a microbiota de indivíduos saudáveis brasileiros com o produto RBX2660;
3. Avaliar parâmetros dietéticos na população de indivíduos saudáveis brasileiros.

3 JUSTIFICATIVA

O entendimento sobre as características de microbiomas saudáveis é o primeiro passo para a identificação de possíveis marcadores associados ao desenvolvimento de doenças⁷². A partir desse conhecimento, podem ser desenvolvidas estratégias para auxiliar no diagnóstico, prevenção e tratamento de diversas doenças, por meio do estudo de microbioma^{6,62,73}. A infecção recorrente por *C. difficile* é um exemplo de condição tratada utilizando-se o transplante de microbiota fecal ou, mais recentemente, a suspensão de microbiota fecal sadia (produto RBX2660), com o objetivo de restaurar a comunidade microbiana intestinal de um estado disbiótico para um estado saudável.

O microbioma saudável é de difícil definição, desde o termo saudável até a caracterização de microrganismos constituintes, devido à grande variabilidade intra e interindividual⁶². Os conceitos de microbioma saudável são provenientes de estudos realizados na Europa e na América do Norte, que não podem ser extrapolados para outras populações geograficamente distintas, como a brasileira, devido a diferenças culturais, étnicas, de hábitos alimentares e de industrialização⁶². Diante da escassez de estudos envolvendo o Brasil, o estudo do microbioma da população brasileira sadia representa grande contribuição para o conhecimento do microbioma intestinal saudável.

A redução da diversidade do microbioma é associada ao aumento do risco de infecções, por permitir a proliferação de patógenos, e à ocorrência de doenças, como obesidade, doença inflamatória intestinal, diabetes tipo 1 e 2, dermatite atópica e psoríase^{47,74-80}. O uso de antimicrobianos e a dieta ocidental com alto teor de gordura e açúcar refinado e baixo teor de fibras têm sido associados à redução da diversidade microbiana^{5,17}. Nos países desenvolvidos ocidentais, especula-se o papel do microbioma intestinal com diversidade consistentemente reduzida na maior prevalência de doenças crônicas em relação aos países em desenvolvimento^{5,17,74}. Nesse contexto, é relevante a adequada caracterização dos hábitos dietéticos da população do estudo para a identificação de possíveis associações com a avaliação taxonômica encontrada.

4 REVISÃO DA LITERATURA

O conhecimento sobre microbioma intestinal, inicialmente proveniente de estudos de cultura de microrganismos expandiu-se, permitindo o entendimento da organização microbiana e a interação entre várias espécies em comunidades complexas¹¹. Resultados de experimentos em animais e, estudos celulares, fisiológicos e epidemiológicos demonstraram que essas comunidades podem desempenhar um papel importante sobre a saúde humana e o risco de doenças e participar ativamente no desenvolvimento de resistência microbiana e na resposta a medicamentos¹⁸.

Inicialmente, por meio da cultura fecal, *Escherichia coli*, microrganismo Gram negativo anaeróbio facultativo foi considerado um dos mais principais constituintes do microbioma intestinal^{5,11}. O desenvolvimento de técnicas de cultivo anaeróbio permitiu a identificação de mais espécies microbianas intestinais por meio de registros que apontavam o gênero *Bacteroides* e cocos anaeróbios prevalentes e abundantes, enquanto os gêneros *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e anaeróbios facultativos, como *E. coli*, presentes em menor número^{5,81}. Entretanto, os estudos que utilizam cultura apresentam limitação quanto à capacidade de isolar e identificar espécies e cepas bacterianas, principalmente em habitats com menor densidade microbiana⁵. Quando se leva em consideração a avaliação de fungos, vírus e outros eucariotos, essa limitação é ainda maior devido às dificuldades técnicas de cultivo⁵.

O avanço de técnicas que dispensam a realização de cultura, como sequenciamento do material genético e hibridização *in situ* de fluorescência (FISH), permitiu a identificação mais precisa de espécies por meio da análise de DNA⁵. Uma variedade de amostras biológicas pode ser analisadas por meio de métodos de sequenciamento, em que o material genético é extraído e dividido em fragmentos de ácidos nucleicos⁸⁸.

A técnica de PCR universal é uma abordagem direcionada que utiliza *primers* projetados a partir de regiões altamente conservadas, como os genes de RNA ribossômico (rRNA) 16S que são universalmente conservados entre bactérias⁸². Os primeiros estudos utilizando o gene 16S RNA ribossomal verificaram que os gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e a espécie *Eubacterium*

rectale representavam dois terços do microbioma intestinal⁸³. Esses dados foram corroborados por estudos subseqüente nos quais, *Bacteroides* sp., *Clostridium* cluster XIVa e *Clostridium* grupo IV representavam de 85-95% das espécies conhecidas isoladas de amostras fecais⁸⁴⁻⁸⁶. Essa técnica tem como principal desvantagem a menor precisão^{82,87}. A avaliação de diversidade pode ser prejudicada pela presença de várias cópias de 16S no genoma de uma mesma bactéria, além do compartilhamento de genes semelhantes por diferentes espécies e cepas, impossibilitando a distinção entre elas⁸⁷. Além disso, não avalia outros constituintes do microbioma, como vírus e eucariontes, e só identifica microrganismos já conhecidos⁸⁷.

Depois dos estudos utilizando o gene 16S RNA ribossomal, a técnica de sequenciamento gênico de alto rendimento, denominada *shallow shotgun*, foi desenvolvida⁸². É um método de extração imparcial ou não direcionado, em que todo o material genético presente em uma amostra é extraído e analisado simultaneamente^{82,87}. São constituídas bibliotecas separadas de DNA e RNA; a biblioteca de DNA é usada para identificação de bactérias, fungos, vírus de DNA e parasitas, enquanto a biblioteca de RNA é usada para identificação de vírus de RNA e genes específicos^{82,87}. Apresenta como vantagens a maior precisão, gerando dados com maior quantidade, qualidade e variedade; permite a pesquisa de genes específicos como os relacionados à virulência ou resistência antimicrobiana e a identificação de genes que codificam funções biológicas^{82,87}.

O conjunto de dados de sequenciamento é então analisado e submetido a uma etapa inicial de pré-processamento que consiste em filtragem de baixa qualidade e complexidade, com objetivo de remover artefatos provenientes de erros do instrumento de sequenciamento e na preparação das amostras e de possíveis contaminações com material genético⁸². Após essa etapa, é realizada a remoção do material genético do hospedeiro⁸². Por meio de algoritmos de bioinformática, os segmentos de ácidos nucleicos são analisados, identificados e organizados em um catálogo de genes microbianos - as bibliotecas de sequenciamento - contendo o material genético dos microrganismos do ambiente analisado⁸⁸. E, por fim, os genes são agrupados em genomas e, então, alinhados a um banco de dados de referência para atribuir cada sequência a um táxon microbiano (bactérias, fungos, protozoários e, ainda, representantes do domínio Archaea) e determinar sua abundância na amostra⁸².

Essas técnicas de sequenciamento genético de alto rendimento permitiram o desenvolvimento da metagenômica, que é o estudo da sequência genética de uma comunidade microbiana e, por meio dela, da diversidade taxonômica e das propriedades funcionais dos seus membros em um determinado habitat^{3,86-88}. Ao contrário dos estudos genômicos convencionais, em que as espécies microbianas são avaliadas isoladamente, a metagenômica considera as interações entre os microrganismos e a influência de tais interações sobre a comunidade de determinado habitat, permitindo uma análise mais eficaz de comunidades microbianas complexas⁸⁸. Esse avanço também permitiu a identificação de grande parte das espécies microbianas ainda não identificadas^{88,89}.

As definições iniciais de microbioma saudável foram estabelecidas a nível taxonômico como um conjunto de microrganismos presente de forma predominante nos indivíduos saudáveis, de modo que qualquer alteração na composição microbiana seria definida como disbiose^{5,72}. O conceito atual refere-se a um núcleo funcional saudável definido a partir de um conjunto de funções metabólicas e moleculares realizadas por um microbioma em um habitat específico, que não necessariamente é constituído pelos mesmos microrganismos em todos os indivíduos⁵. Esse conjunto de funções inclui a existência microbiana e colonização (adesão às células hospedeiras e utilização de energia); a capacidade de resistir a estressores externos, como dieta, medicações e competição com microrganismos patogênicos (resistência) e a posterior capacidade de retornar a um estado saudável (resiliência), garantindo sua estabilidade ao longo do tempo^{1,5,89}. Além disso, essas funções abrangem processos específicos desempenhados por cada microbioma em seu habitat (produção e metabolismo de substâncias), garantindo o estabelecimento de relações simbióticas com o hospedeiro^{5,90}.

A presença de diferentes microrganismos capazes de desempenhar funções semelhantes, chamada de redundância funcional, é determinante para o desenvolvimento e estabilidade temporal de um microbioma saudável^{62,75,91}. Dessa forma, apesar das variações de composição inter e intra individual do microbioma intestinal, a função metabólica é conservada⁶². Portanto, quanto maior a diversidade, maior a disponibilidade de agentes para desempenhar as funções necessárias à subsistência e maior a capacidade de se restabelecer frente a agentes estressores^{5,91}. Esse conceito reforça a superioridade da definição funcional (metabolômica) em relação à definição taxonômica de microbioma saudável^{62,75}.

Os estudos utilizando *shallow shotgun* reforçaram a existência de elevada variabilidade entre as amostras, tanto em indivíduos saudáveis quanto em diferentes sítios do mesmo indivíduo, já identificada previamente em estudos com 16S RNA⁸⁷. Contudo, a identificação de um conjunto de genes universal reforçou a teoria de núcleo funcional apesar da variabilidade a nível taxonômico⁸⁷.

A caracterização do microbioma intestinal de indivíduos saudáveis foi alvo de estudos em vários continentes. Os primeiros estudos realizados nos Estados Unidos e Japão, envolvendo um pequeno número de indivíduos saudáveis, permitiram a caracterização de três gigabases de sequência gênica microbiana^{3,92}. Houve também a identificação de semelhanças e diferenças na constituição do microbioma entre as duas populações, bem como de diferenças entre adultos e crianças no estudo japonês^{3,92}.

O primeiro grande estudo a avaliar o microbioma intestinal de indivíduos saudáveis, *Metagenomes of the Human Intestinal Tract (MetaHIT)*, incluiu uma coorte de 124 adultos europeus, predominantemente saudáveis, em 2010, com resultados consistentes com os de estudos anteriores: 80% dos genes microbianos de 89 genomas de referência foram identificados⁸⁹. Quase todos os genes identificados foram de origem bacteriana, equivalente a cerca de mil espécies, com uma média de 160 espécies por indivíduo, estimando-se que quase 40% dos genes eram compartilhados por pelo menos metade da coorte⁸⁹. Uma pequena proporção, cerca de 0,8% foram de origem archeal e 0,1%, eucariótica e viral⁸⁹. A avaliação metagenômica identificou 75 espécies comuns a 50% dos indivíduos e 57 espécies comuns a 90%, com elevada variabilidade de abundância (12 a 2.200 vezes) para essas 57 espécies⁸⁹. Foi ainda identificado um metagenoma compartilhado pelos indivíduos da coorte, correspondente a um núcleo funcional incluindo funções importantes para a interação hospedeiro-bactéria, como a degradação de polissacarídeos complexos, a síntese de ácidos graxos de cadeia curta, aminoácidos e vitaminas indispensáveis⁸⁹.

Um outro estudo, denominado Projeto Microbioma Humano (HMP), avaliou o microbioma de um total de 4.788 amostras de 18 sítios corporais de 242 adultos saudáveis nos Estados Unidos⁶. Em todos os indivíduos, foi utilizado 16S RNA e, em 139 indivíduos, *shotgun*⁶. Para avaliar a estabilidade temporal do microbioma, 131 indivíduos foram submetidos à amostragem em tempo adicional⁶. Os resultados evidenciaram grande diversidade microbiana entre os diferentes habitats e em um

mesmo habitat entre indivíduos distintos⁶. A variação foi consistentemente menor em um mesmo sujeito ao longo do tempo do que entre sujeitos, tanto na composição do microbioma quanto na função metabólica⁶.

Um dos objetivos do HMP era identificar a existência de um conjunto de microrganismos, genes ou capacidades funcionais de determinado habitat corporal, compartilhado por todos ou pela grande maioria dos humanos, que constituiria o microbioma central^{6,90}. Nenhuma unidade taxonômica foi encontrada em todos os habitats e indivíduos, mas cada habitat corporal possui um ou alguns táxons presentes em quase todos os indivíduos^{6,90}. Em relação ao microbioma intestinal, verificou-se amplas variações da relação entre *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, com dominância de *Bacteroidetes* em alguns e minoria em outros em que predominavam *Firmicutes*^{6,90}.

Outros estudos tentaram estabelecer padrões de microbioma intestinal de acordo com gêneros bacterianos predominantes. Em 2011, o agrupamento de amostras metagenômicas fecais humanas de três continentes resultou na proposta de três enterótipos, independentes de idade, sexo, formação cultural e localização geográfica^{93,94}. O enterótipo 1, com predomínio do gênero *Bacteroides*; o enterótipo 2, do gênero *Prevotella*, cuja abundância é inversamente correlacionada com *Bacteroides* sp.; e o enterótipo 3, com predomínio do filo *Firmicutes*, principalmente o gênero *Ruminococcus*^{93,94}. Essa caracterização possui limitações, pois nem sempre há diferenciação tão bem definida, além de não levar em consideração as variações nos níveis de espécies e cepas que podem ser relevantes para diferenças funcionais entre indivíduos⁹³.

Esses resultados demonstram, portanto, que uma ampla variedade de conjuntos de microrganismos pode produzir um microbioma central a nível funcional, e que os desvios desse núcleo podem estar associados a saúde e doença, como a obesidade associada à redução de diversidade bacteriana e alteração na representação de genes bacterianos e vias metabólicas⁹⁵.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo faz parte de uma linha de pesquisa sobre mapeamento de microbioma intestinal saudável realizada pela *Rebiotix*, empresa de biotecnologia do grupo *Ferring* focada em estudos de microbioma intestinal e suas possíveis aplicações no tratamento de doenças associadas à disbiose. O produto RBX2660, suspensão de microbiota fecal de indivíduos saudáveis, foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de infecção recorrente por *Clostridioides difficile*¹⁰⁷.

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 42475420.2.0000.5149) e os indivíduos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

5.2 PARTICIPANTES

O estudo incluiu indivíduos de ambos os sexos, entre 18 e 49 anos, definidos nesse estudo como saudáveis a partir da aplicação de critérios de exclusão semelhantes a de estudos de referência em microbioma saudável, relativos a condições que poderiam influenciar a estabilidade do microbioma, conforme especificado a seguir^{97,98}.

5.2.1 Critérios de exclusão:

- a) Índice de massa corporal (IMC) menor do que 18 ou maior ou igual a 30;
- b) História de doença gastrointestinal:
 - b.1 Inflamação intestinal crônica (por exemplo, doença celíaca, retocolite ulcerativa, doença de Crohn);
 - b.2 Síndrome do intestino irritável;
 - b.3 Gastroenterite infecciosa, colite, diarreia crônica ou persistente de origem desconhecida;
 - b.4 Infecção recorrente por *Clostridioides difficile*;
 - b.5 Gastrite ou infecção por *Helicobacter pylori* não tratada;

- b.6 Constipação intestinal crônica;
- b.7 Existência de pólipos ou massas gastrointestinais, displasia ou câncer;
- b.8 Cirurgias do trato gastrointestinal nos últimos 5 anos.
- c) História de doenças pulmonares, hematológicas, cardiovasculares, hepáticas ou renais crônicas clinicamente significativas (não resolvidas, que requerem tratamento médico contínuo ou medicação);
- d) Cirurgia do trato gastrointestinal nos últimos 5 anos;
- e) História de diabetes tipo 1 ou tipo 2;
- f) Uso de antibióticos ou antiparasitários nos últimos 3 meses;
- g) Uso dos seguintes medicamentos nos últimos 6 meses: metformina, drogas imunossupressoras, inibidores de bomba de prótons ou probióticos;
- h) Realização de dietas com restrição de FODMAPs (oligossacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos e polióis fermentáveis) ou glúten no mês anterior;
- i) Tabagismo ativo;
- j) Infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite C (HCV) ou hepatite B (HBV);
- l) Mulheres gestantes ou lactantes;
- m) Sintomas respiratórios sugestivos de infecção por COVID-19.

5.3 MÉTODOS

5.3.1 Entrevista de triagem e aplicação de questionário

O recrutamento dos indivíduos foi inicialmente realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e incluiu funcionários dos setores administrativo e assistencial. Em seguida, foi estendido aos acadêmicos da Faculdade de Medicina da UFMG. Neste processo, os possíveis participantes eram solicitados a sugerirem outros participantes de seu ciclo de convívio pessoal.

Os indivíduos foram submetidos à entrevista de triagem inicial de maneira remota entre os meses de janeiro e setembro do ano de 2021, devido às restrições impostas pela pandemia da COVID-19. Aqueles que não apresentavam condições impeditivas à caracterização de um possível indivíduo sadio, receberam o TCLE e foram também convidados a responderem questionário sobre hábitos de vida e dados específicos de histórico médico (APÊNDICE B).

5.3.2 Coleta de amostras de sangue para exclusão de infecções virais e gestação

Todos os participantes selecionados foram submetidos à coleta de amostras de sangue para exclusão de infecções por HIV, HBV ou HCV, por meio da pesquisa dos anticorpos anti-HIV, anti-HCV, anti-HBc total e IgM e antígeno HBsAg. As mulheres foram submetidas também à dosagem de beta-HCG sérico para exclusão de gestação. As amostras coletadas foram analisadas pelo laboratório São Paulo e os indivíduos foram incluídos no estudo após acesso aos resultados negativos.

5.3.3 Coleta e armazenamento de amostras de fezes

Foi fornecido aos indivíduos selecionados um kit coletor de fezes, ColOff®, constituído de frasco plástico estéril com pá coletora e pipeta, além de revestimento para assento sanitário, evitando possível contaminação com o microbioma ambiental. Após a coleta, as amostras foram divididas em duas alíquotas de aproximadamente um grama de material fecal por frasco, congeladas a -80°C , sem adição de estabilizadores, em um período de até quatro horas, e armazenadas no Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

5.3.4 Avaliação dietética e nutricional

Os participantes foram convidados a participar de avaliação dietética e nutricional, realizada por nutricionista por meio de recordatório alimentar de 24 horas (R24h). As medidas caseiras foram convertidas em gramas com auxílio da Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras e, para a estimativa dos macro e micronutrientes, foram utilizadas três tabelas de composição de alimentos: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA), desenvolvida de forma integrada entre a Rede Brasileira de Dados de Composição de Alimentos (Brasilfoods), Universidade de São Paulo (USP) e *Food Research Center* (FoRC/CEPID/FAPESP); Tabela Brasileira de Composição de alimentos (TACO), desenvolvida pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA da

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); e *FoodData Central*, desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América⁹⁸⁻¹⁰¹.

Foi avaliada a ingestão dos grupos alimentares carboidratos, proteínas e lipídios, com individualização de gorduras nos subgrupos saturadas, mono e poli-insaturadas e colesterol. O consumo de fibras, micronutrientes - cálcio, ferro, magnésio, fósforo, sódio, potássio, cobre, zinco - e vitaminas - retinol, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina e vitamina C também foi analisado. Os alimentos foram avaliados também de acordo com a extensão do processamento a que são submetidos, que se refere aos processos físicos, biológicos e químicos que ocorrem após serem obtidos da natureza e antes de serem consumidos¹⁰². Foi utilizado o sistema de classificação NOVA que divide os alimentos em quatro grupos: alimentos *in natura* e minimamente processados (Grupo 1), ingredientes culinários processados (Grupo 2), alimentos processados (Grupo 3) e ultraprocessados (Grupo 4)¹⁰². O grupo 1 inclui frutas, vegetais, grãos, leguminosas, raízes e tubérculos, cogumelos, carnes, aves, peixes e frutos do mar, ovos e leite¹⁰². O grupo 2 engloba sal, óleos vegetais, manteiga, banha, amidos, açúcar, melaço, mel e outras substâncias extraídas de alimentos ou da natureza e utilizadas na culinária¹⁰². O grupo 3 compreende vegetais, frutas e legumes enlatados ou engarrafados; nozes e sementes salgadas ou açucaradas; carnes salgadas, curadas ou fumadas; peixe enlatado; frutas em calda; frutos secos açucarados e queijos¹⁰². E, por fim, o grupo 4 é o dos alimentos ultraprocessados: bebidas enlatadas; lanches embalados doces ou salgados; biscoitos, pastelaria, bolos; cereais adoçados e em barras; margarinas; bebidas lácteas adoçadas; extratos de carne e frango; molhos “instantâneos”; fórmulas infantis; pizza, salsichas e hambúrgueres¹⁰².

Os dados obtidos foram utilizados para calcular o valor calórico total (VCT) e por quilograma de peso corporal, além da porcentagem desse aporte total correspondente a cada macronutriente e ao grau de processamento dos alimentos. Os cálculos foram realizados no *software Microsoft Excel®*. Também foi realizado o cálculo do Índice de Qualidade de Dieta Revisado (IQD-R), correspondente ao indicador norte-americano *Healthy Eating Index* (HEI) utilizado em estudos internacionais de microbioma, adaptado e validado para a população brasileira, revisado após a publicação do Guia Alimentar para a População Brasileira¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Trata-se de um indicador de qualidade da dieta, obtido por uma pontuação distribuída em 12 componentes (9 grupos alimentares, 2 nutrientes e a soma do valor energético

proveniente da ingestão de gordura sólida, álcool e açúcar de adição) que caracterizam diferentes aspectos de uma dieta saudável (Tabela 1)¹⁰⁶.

Tabela 1 – Distribuição da pontuação e das porções dos componentes do Índice de Qualidade da Dieta original e revisado.

Componentes	Pontuação (pontos)				
	0	5	8	10	20
IQD					
Fruta total	0	←	→	3 a 5 porções	
Verduras e Legumes	0	←	→	4 a 5 porções	
Cereais totais ^a	0	←	→	5 a 9 porções	
Leite e derivados	0	←	→	3 porções	
Carnes e ovos	0	←	→	1 a 2 porções	
Leguminosas	0	←	→	1 porção	
Gordura total	≥ 45	←	→	≤ 30% do VET	
Sódio	≥ 4,8	←	→	≤ 2,4 g	
Colesterol	≥ 0,45	←	→	≤ 0,3 g	
Variedade da dieta	≤ 3,0	←	→	≥ 8,0 tipos de alimentos	
HEI-2005					
Fruta total ^b	0	↔	↔	≥ 0,8 copo eq/1.000 kcal	
Fruta inteira ^c	0	↔	↔	≥ 0,4 copo eq/1.000 kcal	
Vegetais totais	0	↔	↔	≥ 1,1 copo eq/1.000 kcal	
Vegetais verdes-escuros e alaranjados e Leguminosas	0	↔	↔	≥ 0,4 copo eq/1.000 kcal	
Cereais totais	0	↔	↔	≥ 3,0 unidade eq/1.000 kcal	
Cereais integrais	0	↔	↔	≥ 1,5 unidade eq/1.000 kcal	
Leite e derivados	0	←	→	≥ 1,3 copo eq/1.000 kcal	
Carnes e leguminosas	0	←	→	≥ 2,5 unidade eq/1.000 kcal	
Óleos	0	←	→	≥ 12 g/1.000 kcal	
Gordura saturada	≥ 15	←	→	10 ↔ 7% do VET	
Sódio	≥ 2,0	←	→	1,1 ↔ ≤ 0,7 g/1.000 kcal	
Gord_AA	≥ 50	←	→	≤ 20% do VET	
IQD_Revisado					
Frutas totais ^b	0	↔	↔	1,0 porção/1.000 kcal	
Frutas integrais ^c	0	↔	↔	0,5 porção/1.000 kcal	
Vegetais totais ^d	0	↔	↔	1,0 porção/1.000 kcal	
Vegetais verdes-escuros e alaranjados e Leguminosas ^d	0	↔	↔	0,5 porção/1.000 kcal	
Cereais totais ^a	0	↔	↔	2,0 porções/1.000 kcal	
Cereais integrais	0	↔	↔	1,0 porção/1.000 kcal	
Leite e derivados ^e	0	←	→	1,5 porção/1.000 kcal	
Carnes, ovos e leguminosas	0	←	→	1,0 porção/1.000 kcal	
Óleos ^f	0	←	→	0,5 porção/1.000 kcal	
Gordura saturada	≥ 15	←	→	10 ↔ 7% do VET	
Sódio	≥ 2,0	←	→	1,0 ↔ ≤ 0,7 g/1.000 kcal	
Gord_AA	≥ 35	←	→	≤ 10% do VET	

^a Cereais totais = representa o grupo dos Cereais, raízes e tubérculos

^b Inclui frutas e sucos de frutas naturais

^c Exclui frutas de sucos

^d Inclui leguminosas apenas depois que a pontuação máxima de Carnes, ovos e leguminosas for atingida

^e Inclui leite e derivados e bebidas à base de soja

^f Inclui as gorduras mono e poliinsaturadas, óleos das oleaginosas e gordura de peixe

IQD: Índice de Qualidade da Dieta; HEI: *Healthy Eating Index*; Gord_AA: Calorias provenientes da gordura sólida, álcool e açúcar de adição; VET: Valor Energético Total; Eq: equivalente

Fonte: Previdelli, Agatha & Andrade, Samantha & Monfort-Pires, Milena & Ferreira, Sandra & Fisberg, Regina & Marchioni, Dirce. (2011). Índice de Qualidade da Dieta Revisado para população brasileira. *Revista de Saúde Pública*. 45. 794-798.

5.3.5 Análise de amostras fecais

Uma vez completada a coleta de toda a coorte, um frasco de cada amostra dos participantes foi enviado para a empresa *Rebiotix*, Roseville, Minnesota, Estados Unidos da América, onde foi realizada a avaliação taxonômica do material fecal por meio de técnica de sequenciamento genético de alto rendimento *shallow shotgun*.

O material genético foi extraído das amostras com *PowerSoil® Pro* (QIAGEN) automatizado para alto rendimento no *QiaCube® HT* (QIAGEN), usando Placas *Powerbead Pro* (QIAGEN) com esferas cerâmicas de 0,5 mm e 0,1 mm. As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas com um procedimento adaptado do kit *Illumina® DNA Prep* e o material genético sequenciado no *Illumina® NextSeq* usando terminação única 1x150 e *NovaSeq* usando 1x100 leituras.

As amostras foram filtradas por qualidade, com remoção de amostras com menos de 10.000 leituras de sequência, pontuação Q < 30 ou comprimento < 50 bases. A análise dos dados foi realizada computacionalmente alinhando as leituras a um banco de dados de genoma humano usando *Bowtie2*, *John Hopkins University*, com uma pontuação mínima de alinhamento de $[-0,6 + -0,6 * L]$, em que L é o comprimento da leitura. Os arquivos FASTQ pós-QC foram, em seguida, convertidos para arquivos FASTA usando *sh17*, depois cortado para um comprimento máximo de 100 bp. Esses FASTAs foram usados como insumos para as etapas de análise subsequentes, sendo processados para dados de unidades taxonômicas operacionais (OTU) por meio de um banco de dados (*Diversigen*).

O microbioma da coorte brasileira foi comparado com a composição microbiana do produto RBX2660, uma suspensão de microbiota preparada a partir de fezes humanas doadas por indivíduos americanos saudáveis, aprovado nos Estados Unidos pelo FDA para tratamento de infecção recorrente por *Clostridioides difficile*¹⁰⁶. Os dados da coorte brasileira e do RBX2660 foram coletados usando métodos idênticos e submetidos a métodos de análise taxonômica idênticos, permitindo que os dados taxonômicos fossem comparados de forma padronizada.

O RBX2660 foi produzido a partir de material fecal de doadores selecionados por meio do preenchimento de um questionário de saúde e estilo de vida para avaliação de critérios de exclusão semelhantes aos utilizados para a coorte brasileira. Em seguida, foram submetidos à coleta de sangue para pesquisa de HIV, hepatites A, B e C, e sífilis, além de coleta de fezes para pesquisa de toxina de *Clostridioides*

difficile, norovírus, rotavírus, adenovírus, ovos e parasitas, enterococos resistentes à vancomicina, *Vibrio* sp., *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina. Cada dose de RBX2660 consistia de 50 gramas de fezes humanas em 150 mL de soro fisiológico 0,9% em veículo de polietilenoglicol 3350, contendo $\geq 10^7$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL de suspensão, incluindo $> 1 \times 10^5$ UFC/mL de *Bacteroides* sp., em uma bolsa de enema de dose única pronta para uso.

5.3.6 Análises estatísticas

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição dos dados demográficos dos participantes. A partir da verificação da distribuição gaussiana ou não das variáveis, foram obtidas as medidas de tendência central e de dispersão de IMC e idade. O programa SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA) foi utilizado para as análises.

As análises estatísticas e a visualização dos resultados de OTU foram realizadas pela BioRankings Analytics, St. Louis, Minnessota, EUA. A distribuição multinomial de Dirichlet (DM) foi utilizada para avaliar as abundâncias relativas médias de grupo no nível de classe taxonômica (π), com limites de confiança, usando estimativa de máxima verossimilhança¹⁰⁸.

5.3.7 Avaliação de disbiose intestinal

O microbioma da coorte brasileira foi avaliado por meio do *Microbiome Health Index* (MHI), calculado a partir da razão (*Bacteroidia* + *Clostridia*) / (*Gammaproteobacteria* + *Bacilli*). É um índice desenvolvido para analisar a alteração de microbioma associada ao uso de antibióticos, mas que também apresentou boa acurácia para avaliação do microbioma de indivíduos sadios¹⁰⁹.

5.3.8 Avaliação de diversidade microbiana

A diversidade alfa foi avaliada por meio do Índice de *Shannon*, um indicador utilizado para estimar de forma quantitativa a diversidade de grupos taxonômicos presentes em uma amostra¹¹⁰.

6 RESULTADOS

6.1 PARTICIPANTES

Dentre os 74 indivíduos submetidos à entrevista inicial, 50 foram selecionados após preenchimento do questionário e realização de exames de sangue. Os 24 indivíduos foram excluídos devido a uso de medicamentos (8), especificamente inibidores de bombas de prótons (4), antimicrobianos (2), antiparasitários (1) e imunossupressores (1); doenças gastrointestinais (7); tabagismo (5); indisponibilidade de realização de exames de sangue (3) e cirurgia gastrointestinal recente (1). Não houve exclusão de participantes devido a exames de sangue positivos para infecções virais ou gestação. A amostra de um dos participantes necessitou de ser desprezada por atraso no congelamento e não participou da análise taxonômica, totalizando 49 amostras.

As características demográficas dos participantes estão sintetizadas na Tabela 2. A média de idade foi 31,2 anos (\pm 6,8), a mediana de IMC foi 24 (22-27) e 25 participantes eram do sexo feminino (51%). Em relação à prática de atividade física, 22 participantes (44,9%) realizavam regularmente, sendo que 16 deles (32,6%) com frequência igual ou superior a 3 vezes por semana. Quanto ao grau de instrução, 25 participantes (51%) tinham o ensino superior completo, enquanto treze apresentavam ensino superior incompleto (26,5%), dois possuíam curso técnico, oito concluíram o ensino médio e dois completaram o ensino fundamental. A média de horas de sono foi de 7,1 (\pm 0,85). Em relação ao uso crônico de medicamentos, 17 (34,7%) participantes relataram o uso, sendo eles anticoncepcional combinado oral (8); espironolactona para tratamento de acne (2); antidepressivos e ansiolíticos (10), especificamente fluoxetina (1), topiramato (1), venlafaxina (2), desvenlafaxina (3), alprazolam (1), serrazina (1), bupropiona (1), escitalopram (2), mirtazapina (1) e lamotrigina (1).

Tabela 2 - Dados demográficos e associados ao estilo de vida dos indivíduos saudáveis.

Variável	N (%) / média (DP) / mediana (IIQ)
Sexo feminino	25 (51%)
Idade (média), anos	31,2 (± 6,8)
Altura (mediana), cm	169 (162-175)
Peso (mediana), kg	71 (64-78)
IMC (mediana), kg/m ²	24 (22-27)
Ensino superior completo, n (%)	25 (51%)
Ensino superior incompleto, n (%)	13 (26,5%)
Ensino técnico, n (%)	2 (4%)
Ensino médio, n (%)	8 (16,3%)
Ensino fundamental, n (%)	2 (4%)
Prática de atividade física, n (%)	22 (44,9%)
Horas de sono (média)	7,1 (± 0,85)

6.2 AVALIAÇÃO DIETÉTICA E NUTRICIONAL

A ingestão alimentar foi avaliada em 36 indivíduos, 19 do sexo feminino (52,8%), por meio da quantificação absoluta e proporcional dos grupos alimentares, além do cálculo do IQD-R e das calorias por grau de processamento de alimentos. Os resultados estão representados na tabela 3, incluindo o percentual de calorias provenientes de alimentos *in natura* e minimamente processados (Grupo 1), ingredientes culinários processados (Grupo 2), alimentos processados (Grupo 3) e ultraprocessados (Grupo 4) que também foram analisados. O banco de dados completo da avaliação dietética encontra-se nos APÊNDICES C e D.

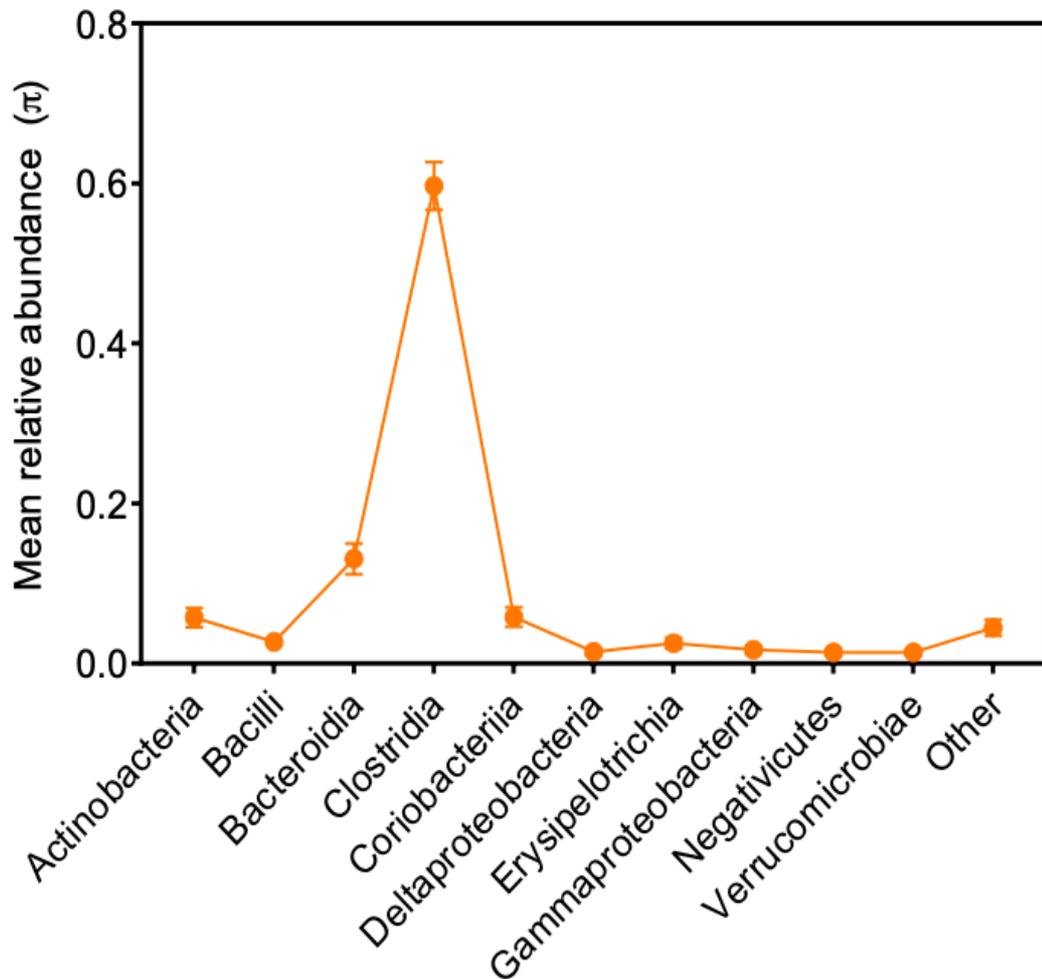
Tabela 3 - Análise descritiva do valor calórico, macronutrientes, IQD-R, e valor calórico por grau de processamento.

Componente da dieta	Mediana (IIQ)
Kcal	1.599 (1.280-2.435)
Kcal sexo feminino	1.303 (1.030-1.653)
Kcal sexo masculino	2.166 (1.599-2.649)
Kcal/kg de peso	22,59 (17,78-29,60)
Kcal/kg de peso sexo feminino	21,43 (16,72-25,11)
Kcal/kg de peso sexo masculino	28,83 (19,86-35,98)
Carboidratos (% do VCT)	45,62 (37,52-54,68)
Proteínas (% do VCT)	18,72 (12,99-25,31)
Gorduras totais (% do VCT)	32,78 (28,30-39,59)
Gorduras saturadas (g)	21,54 (15,97-27,77)
Gorduras monoinsaturadas (g)	16,72 (10,93-21,18)
Gorduras poli-insaturadas (g)	11,23 (7,92-16,83)
Colesterol (mg)	240,87 (159,93-431,64)
Fibras (g)	19,69 (10,52-23,65)
IQD-R	68,73 (60,46-76,92)
Grupo 1 (% do VCT)	52,78 (35,83-65,26)
Grupo 2 (% do VCT)	5,45 (3,99-7,60)
Grupo 3 (% do VCT)	17,48 (7,34-29,09)
Grupo 4 (% do VCT)	25,30 (10,09-36,76)

6.3 PERFIL DE MICROBIOMA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS BRASILEIROS SADIOS

A análise do microbioma da coorte de brasileiros sadios evidenciou 5 filos com abundância relativa média (π) acima de 1%: *Firmicutes* (π 60-65%), *Bacteroidetes* (π 10-15%), *Actinobacteria* (π 5-7%), *Proteobacteria* (π 2-3%) e *Verrucomicrobia* (π 1-2%). Em relação às classes, houve predomínio de *Clostridia* (π 60-65%) e *Bacteroidia* (π 10-12%) (figura 1). As classes *Actinobacteria* e *Coriobacteriia*, em seguida, foram encontradas com π de aproximadamente 2% cada (gráfico 1).

Gráfico 1 - Abundância relativa média de Classes.

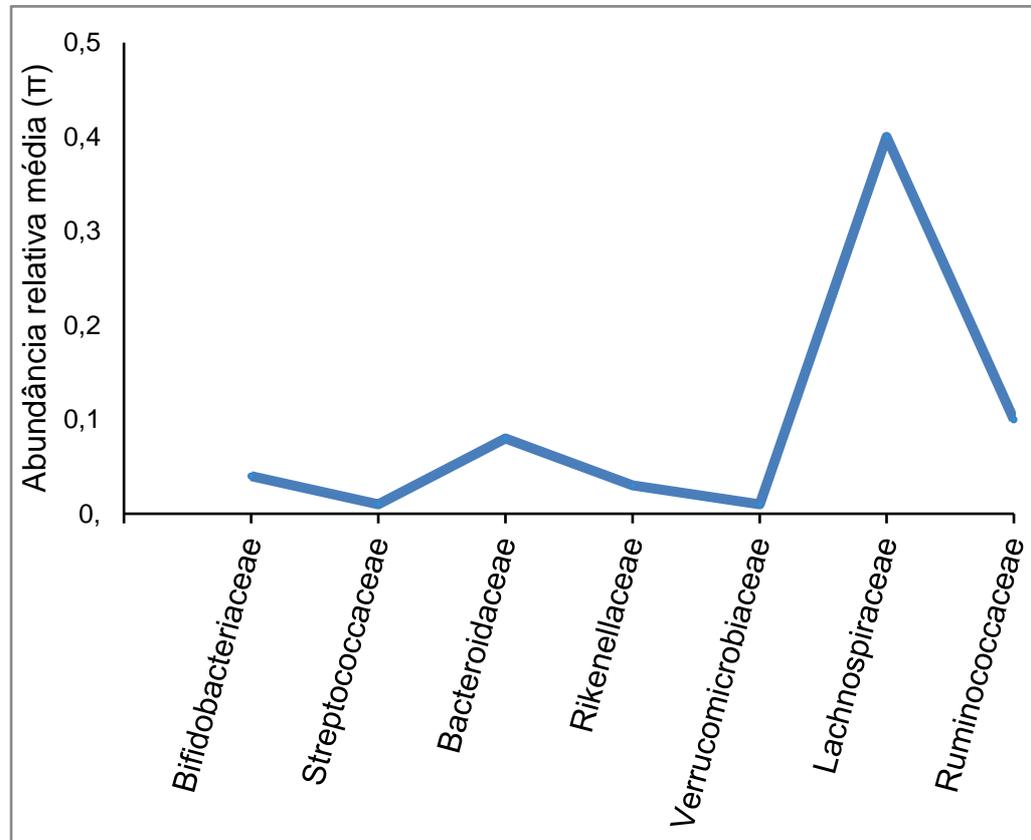


As barras representam o IC de 95%. Pontos sem barras de erro indicam que o IC de 95% é muito pequeno para ser visível no gráfico.

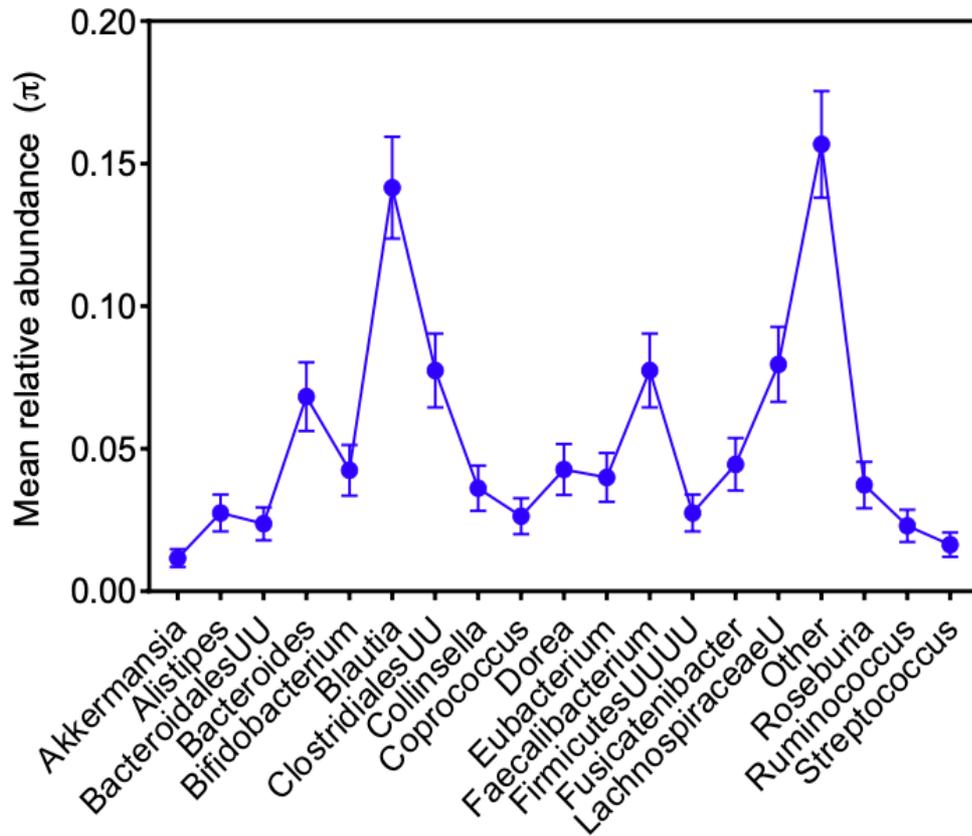
Lachnospiraceae foi a família mais abundante (π 30-40%), seguida por *Ruminococcaceae* (π 10-12%) e *Bacteroidaceae* (π 7-9%). *Eubacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Rikenellaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae* e *Verrucomicrobiaceae* foram as outras famílias com abundância acima de 1% (gráfico 2).

Gráfico 2 - Abundância relativa média de Famílias.

Dados aproximados a partir da abundância relativa média de gêneros.



Em relação aos gêneros, houve predominância de *Blautia* (π 12-15%). Em seguida, com frequência semelhante (π 7-8%), *Bacteroides* e *Faecalibacterium*; além de outros representantes não identificados a nível de gênero, da ordem *Clostridiales* e da família *Lachnospiraceae* (figura 2). Os gêneros *Alistipes*, *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Fusicatenibacter*, *Roseburia* e *Ruminococcus*, além de representantes não identificados a nível de gênero, da ordem *Bacteroidales* e do filo *Firmicutes* apresentaram abundância relativa média entre 2-5%; seguidos por *Akkermansia* e *Streptococcus* com π 1-2% (gráfico 3).

Gráfico 3 - Abundância relativa média de Gêneros.

As barras representam o IC de 95%. Os pontos sem barras indicam que o IC de 95% é muito pequeno para ser visível no gráfico. Os táxons sinalizados com a letra U não foram identificados a nível de gênero e cada U identifica um nível taxonômico acima. LachnospiraceaeU: família; BacteroidalesUU e ClostridialesUU: ordens; FirmicutesUUUU: filo.

O microbioma da coorte brasileira apresentou mediana de pontuação do MHI igual a 61,2 (28,8-136) conforme representado no gráfico 4. A diversidade alfa, quantificada por meio do Índice de *Shannon*, apresentou valor mediano de 1,2 (0,8-1,4), conforme representado no gráfico 5.

Gráfico 4 - Avaliação da disbiose baseado no *Microbiome Health Index* (MHI).

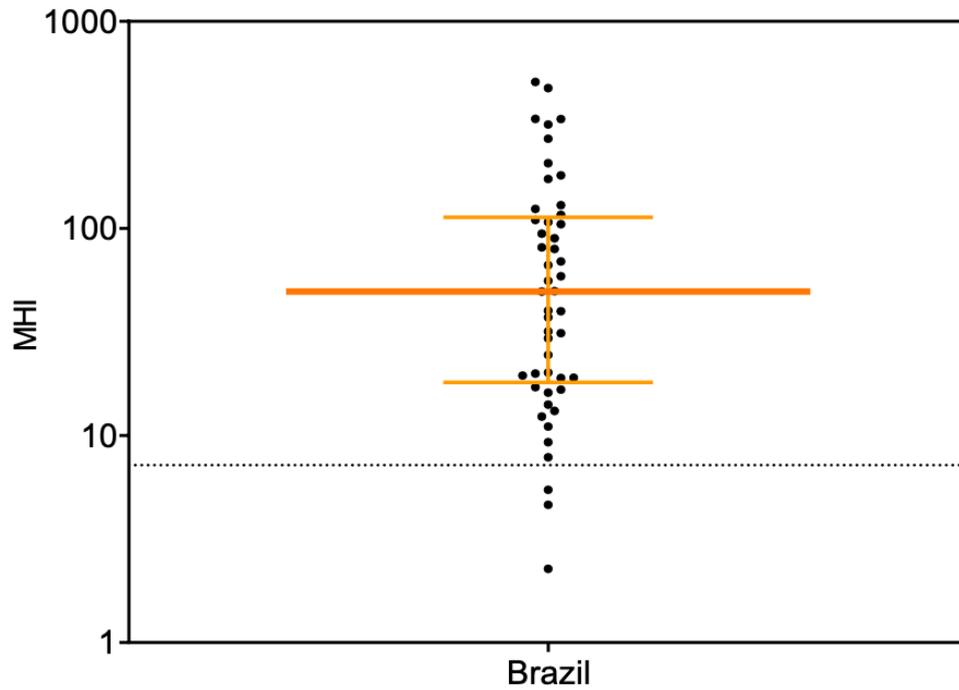


Gráfico de dispersão com linha maior representando mediana e as duas linhas menores, os percentis 25 e 75 (intervalo interquartílico). A linha pontilhada marca o valor do MHI de 7,2 e representa o valor de corte. As amostras acima são consideradas saudáveis, enquanto as amostras abaixo são consideradas disbióticas.

Gráfico 5 - Diversidade alfa representada pelo Índice de *Shannon*.

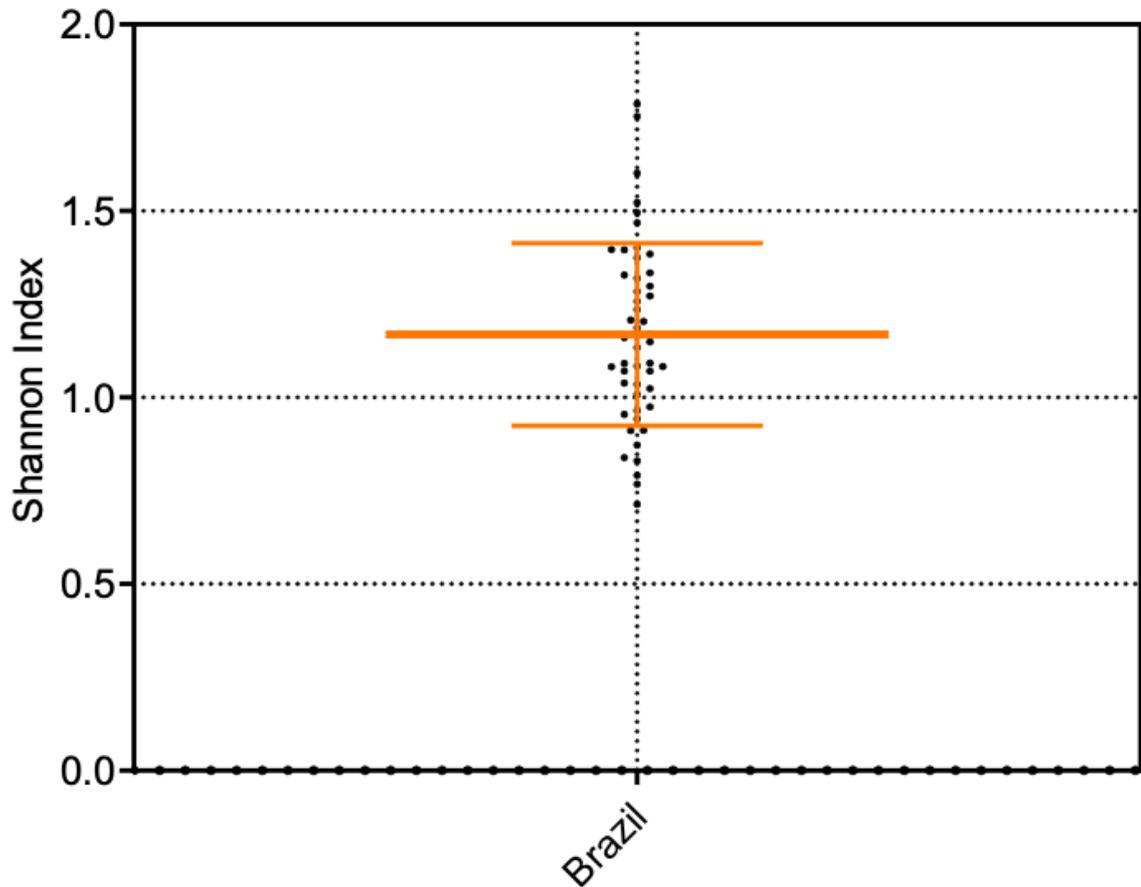
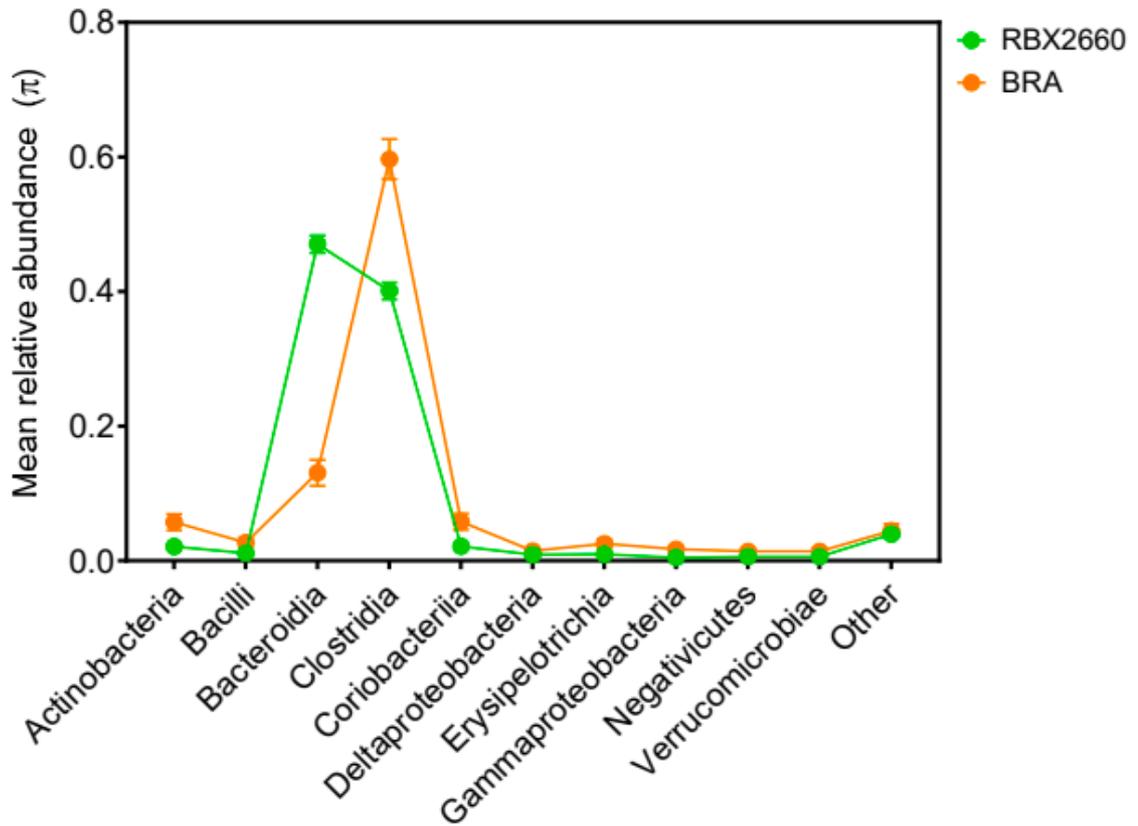


Gráfico de dispersão com linha maior representando mediana e as duas linhas menores os percentis 25 e 75 (intervalo interquartilico).

6.4 COMPARAÇÃO DA COORTE BRASILEIRA COM O PRODUTO RBX2660

O microbioma da coorte de indivíduos brasileiros saudáveis foi comparado ao microbioma constituinte do produto RBX2660 obtido por meio de amostras fecais de indivíduos americanos saudáveis. Na coorte brasileira, prevaleceu a classe *Clostridia* e, no produto RBX2660, a classe *Bacteroidia* (gráfico 6).

Gráfico 6 - Distribuição dos microbiomas a nível de classe em indivíduos brasileiros saudáveis (BRA) e amostras RBX2660.



As barras representam o IC de 95% e pontos sem barras indicam que o IC de 95% é muito pequeno para ser visível no gráfico.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a composição do microbioma intestinal de 49 brasileiros definidos como saudáveis a partir da utilização de critérios semelhantes aos de estudos de referência em microbioma, como o HMP¹¹¹. A adoção desses critérios teve como objetivo permitir comparações entre indivíduos de populações distintas, além, de modo inerente, evitar a inclusão de comorbidades e situações com maior potencial de alterar qualitativa ou quantitativamente o microbioma intestinal.

A amostra, caracterizada por distribuição igualitária de sexo e pertencente à faixa etária entre 18 a 49 anos, minimiza a variabilidade à medida que anula a interferência de fatores, como crescimento, desenvolvimento, envelhecimento e influências hormonais na infância e adolescência. Também, acerca dos dados demográficos, outras características dessa amostra como o predomínio de participantes com ensino superior completo, que em sua maioria não realizava atividade física com frequência superior ou igual a três vezes por semana, acrescenta dados desse perfil de indivíduos e pode ajudar a entender os resultados à medida que comparações futuras forem feitas.

Outro dado relacionado aos hábitos de vida refere-se à alimentação. Para a avaliação do consumo alimentar, foi utilizado o recordatório de 24 horas (R24h), que se mostrou superior ao uso do questionário de frequência alimentar (QFA) semiquantitativo, que faz a estimativa da dieta habitual dos últimos doze meses¹¹². Ainda que todos os métodos de aferição do consumo alimentar apresentam limitações, o uso do QFA foi relacionado à superestimativa da ingestão de frutas e hortaliças, falseando as avaliações de qualidade de dieta em estudos avaliando o IQD-R^{112,113}.

A mediana do consumo calórico foi de 1.599 (1.280-2.435) kcal que se traduz em 22,59 (17,78-29,60) kcal/kg de peso corporal, sendo 1.303 (1030-1653) kcal e 21,43 (16,72-25,11) kcal/kg para sexo feminino e 2.166 (1.599-2.649) kcal e 28,83 (19,86-35,98) kcal/kg para o masculino. Esses valores são considerados adequados conforme as recomendações nutricionais para adultos^{114,115}. Um pouco mais da metade (52,78%) do total de calorias diárias foi proveniente de alimentos *in natura* e minimamente processados, como frutas, leite, grãos e cereais, seguidos em ordem descendente pelos alimentos ultraprocessados, como biscoitos recheados,

refrigerantes e salgadinhos, responsável por 25,30%; alimentos processados, como pães e queijos, representando 17,48%; e ingredientes culinários processados, como óleos, sal, açúcar e farinha, com 5,45%. Estudo transversal dos dados de consumo alimentar individual de 34.000 indivíduos maiores de 10 anos de idade no Brasil evidenciou resultados semelhantes: 58,1% da ingestão energética diária foi proveniente de alimentos *in natura* ou minimamente processados; 20,4% de alimentos ultraprocessados; 10,9% de ingredientes culinários processados; e 10,6% de alimentos processados¹¹⁷. Não há critérios de referência estipulados para determinar faixas ideais de consumo dos diferentes graus de processamento de alimentos. Entretanto, o consumo maior de alimentos ultraprocessados e processados foi associado à ingestão relativamente alta de açúcares livres e de gorduras totais, saturadas e trans, e ao baixo consumo de proteínas e fibras alimentares^{115,117-120}. Este padrão alimentar foi relacionado à obesidade e síndrome metabólica¹¹⁷⁻¹²⁰. A Organização das Nações Unidas (ONU) propôs a valorização do consumo de alimentos ultraprocessados como um indicador da má qualidade das dietas, sem, no entanto, especificação de taxa de consumo ideal^{117,118}. Idealmente, têm sido recomendado preferir o consumo de alimentos não processados e minimamente processados em detrimento de produtos processados e ultraprocessados^{117,118}.

O consumo de carboidratos representou 45% do VCT, enquanto as gorduras somaram 32% e as proteínas, 18%, que são valores considerados adequados, de acordo com evidências de aumento dos riscos de doenças crônicas não transmissíveis, associadas à alimentação, além dos efeitos de carência nutricional^{114,115}. A ingestão diária de colesterol (240 mg) também esteve dentro do valor de referência, enquanto a mediana de ingestão de fibras de 19,69 g/dia (10,52-23,65), foi deficitária em relação à ideal que é de 25 g/dia para o sexo feminino e 38 g/dia para o masculino^{114,115}. O consumo reduzido de fibras e elevado de alimentos com alto teor de gordura e índice glicêmico é característico da chamada "dieta ocidental" de nações industrializadas¹²¹. A fibra não é digerida pelo organismo humano, mas é metabolizada por certas espécies do microbioma intestinal e resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta¹²¹. Portanto, um maior consumo de fibra favorece o crescimento desses microrganismos¹²¹. As sociedades rurais e menos industrializadas apresentam um consumo de fibra significativamente maior e tem como característica uma maior abundância do gênero *Prevotella* em seu microbioma intestinal¹²¹. Já nos indivíduos provenientes de regiões mais industrializadas, há

redução de diversidade e maior abundância dos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Alistipies* e *Blautia*¹²¹. Essas alterações podem ter associação com aumento da prevalência de doença inflamatória intestinal, obesidade, diabetes melito tipo II e síndrome metabólica verificada nessas sociedades¹²¹.

Fontes de dados sobre a tendência do consumo alimentar brasileiro, utilizadas pelo Ministério da Saúde, obtidas por meio do programa Pesquisas de Orçamentos Familiares, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foram utilizadas para estimar a proporção de ingestão de carboidratos, lipídeos e proteínas¹¹⁶. Isto foi feito de maneira indireta, por meio da estimativa de despesas efetuadas com a aquisição de alimentos para consumo no domicílio¹¹⁶. A última, realizada em 2008-2009, evidenciou resultados semelhantes, com consumo energético médio de 1.710 kcal e 2.163 kcal para sexo feminino e masculino, respectivamente¹¹⁶. O consumo de carboidratos representou cerca de 55% do total, lipídios 27% e proteínas 17%, enquanto a ingestão diária de colesterol foi 217 e 276 mg no sexo feminino e masculino, respectivamente, valores considerados adequados conforme as recomendações nutricionais, com exceção para a ingestão de fibras, 18,2 no sexo feminino e 23,5 g no sexo masculino, considerada deficitária¹¹⁶.

O IQD-R, utilizado para verificar a qualidade da dieta neste estudo, demonstrou boa confiabilidade para avaliação e monitoramento da dieta de brasileiros^{105,112}. O valor máximo é de 100 pontos e quanto mais elevado o escore, mais próxima a ingestão se encontra dos intervalos ou quantidades recomendados¹¹². O IQD-R mediano da população do estudo foi de 68,73 (60,46-76,92), semelhante ao de um grande estudo com 15.105 adultos, entre 35 e 74 anos de idade, que incluiu indivíduos de níveis técnico e superior de 6 cidades do Brasil que teve um IQD-R médio de 72,6 pontos¹¹². A utilização do IQD-R apresenta vantagens ao analisar vários componentes da dieta simultaneamente, com base na densidade energética, avaliando sua qualidade, independente da quantidade de alimentos consumida¹¹². Pode ser aplicado a indivíduos e populações e facilita a mensuração de possíveis associações com desfechos de saúde¹¹².

Com relação à avaliação do microbioma, foram evidenciados representantes de cinco filos, em ordem decrescente: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*. A classe *Clostridia* e as famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* do filo *Firmicutes* foram as mais abundantes. No filo

Bacteroidetes, a classe *Bacteroidia* e a família *Bacteroidaceae* foram as mais abundantes. Estudos brasileiros avaliaram o microbioma intestinal de pequenas amostras de controles saudáveis, por meio do sequenciamento genético utilizando o RNA ribossomal 16S, e também identificaram os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* como os mais abundantes¹²²⁻¹²⁵. Em dois estudos, com vinte e oito e dez participantes cada, o filo *Bacteroidetes* e a classe *Bacteroidia* foram os mais abundantes, enquanto outros dois estudos evidenciaram o filo *Firmicutes* como o mais abundante¹²²⁻¹²⁵. Em um desses estudos, envolvendo onze participantes, a classe *Clostridia* e as famílias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Bacteroidaceae* foram as mais frequentes¹²². Enquanto o outro estudo, com sete indivíduos, encontrou os gêneros *Faecalibacterium*, *Blautia* e *Bifidobacterium* como os mais abundantes¹²⁵. Dois desses estudos realizaram avaliação nutricional, mas apenas o estudo envolvendo dez indivíduos exibiu dados relacionados à ingestão calórica total diária e porcentagens relacionadas aos grupos alimentares^{123,124}. Entre os dez indivíduos do grupo controle, cinco eram obesos e os outros cinco com IMC normal¹²⁴. Entre os últimos, a mediana de consumo calórico total foi de 1.802 Kcal (1.527-2.018), sendo majoritariamente proveniente de carboidratos (51,2%), seguido por gorduras (28,8%) e proteínas (6,22%)¹²⁴.

Com base na proposta de classificação do microbioma em três enterótipos, o microbioma da amostra selecionada pode ser classificado como enterótipo tipo 3, caracterizado pelo predomínio do filo *Firmicutes*, principalmente do gênero *Ruminococcus* e grupos relacionados à ordem *Clostridiales* e à família *Lachnospiraceae*¹²⁶. A família *Lachnospiraceae* é bastante heterogênea e faz parte dela espécies que têm sido relacionadas a várias doenças, mas também possui representantes responsáveis pela produção de vários metabólitos essenciais à saúde do hospedeiro, como os ácidos graxos de cadeia curta¹²⁷. Os gêneros *Blautia*, o mais abundante no nosso estudo, e *Roseburia* que esteve presente com abundância de 2%, ambos pertencentes a esta família são considerados os maiores produtores de ácidos graxos de cadeia curta, principal fonte de nutrição dos colonócitos e envolvidos na maturação do sistema imune e no controle de processo inflamatório intestinal¹²⁷. O gênero *Blautia* apresenta, ainda, potencial efeito probiótico, a partir da produção de bacteriocinas capazes de inibir a colonização intestinal por bactérias patogênicas¹²⁶. Especificamente, *Blautia obeum* e *Blautia producta* podem inibir a proliferação de *Clostridium perfringens* e enterococos resistentes à vancomicina¹²⁶. Há ainda

evidências de correlação negativa de espécies do gênero *Blautia* com obesidade, câncer colorretal, diabetes e doença de Crohn, além de associação com aumento de sobrevida na doença do enxerto-versus-hospedeiro¹²⁶. Entretanto, há relatos de maior abundância de *Blautia* em indivíduos com retocolite ulcerativa associada à colangite esclerosante primária, síndrome do intestino irritável e câncer de mama¹²⁶. Esses dados conflitantes são, possivelmente, devido a diferenças a nível de espécies e cepas¹²⁶. Neste contexto, estudos metagenômicos associaram aumento de *Lachnospiraceae* a diabetes melito tipo 2 em humanos e modelos animais¹²⁶. Bactérias integrantes desta família participam ativamente do metabolismo de polissacarídeos, incluindo amido, inulina e arabinóxilano e, por conseguinte contribuem para aumento da obtenção de energia da dieta com efeito nos níveis glicêmicos¹²⁷.

A família *Ruminococcaceae*, que tem no gênero *Faecalibacterium* um dos seus principais representantes, também possui como característica a produção de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente o butirato¹²⁸. A diminuição de sua abundância tem sido implicada em doenças inflamatórias intestinais (retocolite ulcerativa e doença de Crohn), encefalopatia hepática e diarreia associada ao uso de antimicrobianos, além de maior risco de infecção por *Clostridioides difficile*¹²⁸. Presente com abundância relativa média em torno de 7 a 8%, seus membros são considerados comensais, com papel relevante na saúde intestinal, em especial *Faecalibacterium prausnitzii*, uma das bactérias anaeróbicas mais abundantes no microbioma intestinal humano e que exerce papel importante na manutenção da homeostase intestinal¹²⁹. Possui propriedades imunomodulatórias e antiinflamatórias, sendo considerada um indicador de saúde intestinal¹²⁹. A redução de *F. prausnitzii* foi encontrada em indivíduos com doença inflamatória intestinal, diabetes tipo 2 e doença hepática gordurosa¹²⁹.

Em relação ao filo Bacteroidetes, os gêneros *Bacteroides* e *Alistipes* foram os mais abundantes, em torno de 7 a 8% e 2 %, respectivamente. Exercem efeitos benéficos no intestino, mas se comportam como patógenos oportunistas provocando infecções extra-intestinais a partir de translocação bacteriana e bacteremia, incluindo abscessos intra-abdominais e no sistema nervoso central^{130,131}. Espécies do gênero *Bacteroides* atuam na imunomodulação intestinal e competem com microrganismos patogênicos por meio da produção de toxinas antimicrobianas, além de serem os principais produtores de vitamina K e contribuírem para o aumento da densidade

mineral óssea¹³⁰. Quanto ao gênero *Alistipes*, evidências sugerem efeito protetor contra hepatopatia crônica fibrosante e encefalopatia hepática, doenças cardiovasculares e seus fatores de risco, como hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose¹³¹.

No filo *Actinobacteria*, membros do gênero *Bifidobacterium* constituem-se no seu principal representante e estão entre os primeiros microrganismos identificados como constituintes do microbioma intestinal¹³². Na amostra estudada, sua abundância foi em torno de 5%. Têm sido utilizados como probióticos devido a potenciais efeitos benéficos em casos de diarreia e constipação, bem como na prevenção de infecções gastrointestinais, como é o caso da infecção causada pela *E. coli* enterohemorrágica, a partir da síntese de acetato, ácido graxo de cadeia curta que regula função de barreira do epitélio intestinal do hospedeiro¹³². Dois estudos brasileiros que avaliaram o microbioma intestinal de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica e diabetes melito tipo 1, respectivamente, evidenciaram redução de abundância de *Bifidobacterium* quando comparado aos controles sadios^{122,124}. Entretanto, os dados de abundância não foram relatados.

O filo *Proteobacteria* foi o quarto mais abundante, representado pelas classes *Deltaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. Seus gêneros não apresentaram abundância relativa média acima de 1%. O filo *Verrucomicrobia* foi representado pelo gênero *Akkermansia*. A bactéria *Akkermansia muciniphila*, espécie mais estudada do gênero, tem sido associada a possíveis efeitos protetores contra obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares, sendo utilizada como probiótico na síndrome metabólica^{133,134}. Também tem efeito benéfico comprovado na integridade da barreira intestinal, ativação do sistema imune e redução de inflamação¹³³. No entanto, em modelos animais, a proliferação excessiva de cepas de *A. muciniphila*, promovida por dieta deficiente em fibra, exacerbou a inflamação provocada por bactérias patogênicas, por meio da degradação da camada de muco, além de associação com tumorigênese no câncer colorretal em camundongos¹³³.

Estudos metagenômicos internacionais que incluíram indivíduos sadios constataram que o gênero *Blautia* foi também o mais abundante em austríacos (12,79%), enquanto houve domínio do gênero *Bacteroides* em americanos (38,38%), chineses (39,7%), dinamarqueses (39,70%), franceses (13,43%), espanhóis (23,33%) e em, um estudo brasileiro com 18 indivíduos (28,91%)^{6,90,122,138-146}. O gênero *Prevotella* foi predominante em estudos na Malásia (32,65%), Venezuela (24,89%) e

Peru (14,85%), *Eubacterium* na Rússia (12,52%) e *Clostridium* na Suécia (10,31%)^{137,143-147}. Em uma análise de amostras de fezes de 367 indivíduos japoneses saudáveis, entre 0 e 104 anos, foi evidenciada elevada abundância de *Blautia* (16,69%) e *Bifidobacterium* (17,93%) e baixa abundância de *Bacteroides* (11,37%) em adultos (21 a 69 anos)¹³⁷. Nos idosos, verificou-se redução da diversidade, com menor presença de *Blautia*¹³⁷. Tais dados corroboram a tese da existência de padrões de microbioma distintos entre populações diferentes, muito possivelmente influenciada por hábitos alimentares, fatores genéticos, entre outros.

O produto RBX2660, utilizado na comparação com o microbioma da coorte brasileira, é uma suspensão de microbioma preparado a partir de amostras fecais de indivíduos americanos selecionados a partir dos mesmos critérios empregados para compor a coorte brasileira. Por meio dessa análise, foi evidenciada uma composição semelhante, contudo houve um predomínio da classe *Clostridia* na coorte brasileira e *Bacteroidia* no produto.

O MHI, utilizado para avaliação de disbiose intestinal, foi desenvolvido com o objetivo de detectar possíveis alterações microbioma após uso de antimicrobianos¹⁰⁹. No entanto, apresentou boa acurácia para análise do microbioma de indivíduos saudáveis¹⁰⁹. As quatro classes taxonômicas utilizadas, *Bacteroidia*, *Clostridia*, *Bacilli* e *Gammaproteobacteria*, foram escolhidas a partir de evidências de associações com microbioma saudável e disbiose, respectivamente¹⁰⁹. *Bacteroidia* e *Clostridia* são classes envolvidas no mecanismo de resistência à colonização de patógenos, pois atuam modulando a função da barreira intestinal, por meio da metabolização de sais biliares, síntese de ácidos graxos de cadeia curta, competição por nutrientes essenciais e ativação do sistema imunológico do hospedeiro^{7,148}.

Apesar de espécies das classes *Gammaproteobacteria* e *Bacilli* serem comensais e desempenharem papel importante na homeostase e saúde do microbioma, como dos gêneros *Escherichia* e *Lactobacillus*, respectivamente, há também uma variedade de bactérias patogênicas^{109,148}. A proliferação de gamaproteobactérias dos gêneros *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*, e bacilos dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* foi encontrada em vários contextos envolvendo distúrbios metabólicos (diabetes e doenças cardiovasculares) e inflamação intestinal (doença inflamatória intestinal, doença celíaca e câncer colorretal), além de potencialmente prejudicar a resposta imune a outros patógenos^{7,148-152}.

Portanto, um baixo índice, proveniente da redução de *Bacteroidia* e *Clostridia* ou aumento de *Gammaproteobacteria* e *Bacilli*, é consistente com disbiose¹⁰⁹. Nessa amostra de indivíduos brasileiros saudáveis, a mediana do MHI foi de 61,2 (28,8 -136), enquanto o ponto de corte para indicar ausência de disbiose é 7,2, obtido a partir do cálculo para várias coortes de indivíduos saudáveis, em que mais de 90% das amostras apresentaram valor acima de 7,2.¹⁰⁹ Quando este índice foi testado a partir da avaliação a nível de filo, por meio da relação *Firmicutes/Bacteroidetes* e a nível de ordem (*Clostridiales*, *Lactobacillales*, *Enterobacterales* e *Bacteroidales*) não apresentou desempenho superior¹⁰⁹.

O índice de diversidade de *Shannon*, utilizado para avaliar a diversidade alfa, é amplamente utilizado em estudos de microbioma¹⁵³. Ele estima quantitativamente a variabilidade biológica, por meio de dois aspectos diferentes que contribuem para a diversidade em uma comunidade: riqueza (número de espécies) e uniformidade (variedade e abundância relativa)¹⁵³. Quanto mais elevado o índice, maior a diversidade, ficando, em geral, entre 1,5 e 3,5¹⁵³. Entretanto, não apresenta um bom rendimento em amostras pequenas e em populações geneticamente mais heterogêneas, possíveis explicações para o valor não muito elevado verificado no nosso estudo¹⁵³.

8 CONCLUSÃO

O microbioma da coorte de brasileiros saudáveis é constituído por representantes de cinco filos - *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*, em ordem decrescente de abundância. A classe *Clostridia* e a família *Lachnospiraceae* foram as mais abundantes e o gênero *Blautia* foi o predominante. A comparação com o produto RBX2660 evidenciou composição semelhante, com diferença apenas na classe predominante: *Clostridia* na amostra brasileira e *Bacteroidia* no produto.

A avaliação dietética e nutricional evidenciou achados semelhantes a de outros estudos envolvendo a população brasileira, padrão frequentemente encontrado em outras sociedades industrializadas¹²¹. O percentual significativo do consumo energético total proveniente de alimentos processados ou ultraprocessados, considerado indicador de má qualidade da dieta, além da ingestão deficitária de fibras encontrados no estudo têm sido associados à doença inflamatória intestinal, obesidade e síndrome metabólica e podem ter papel relevante na constituição do microbioma intestinal da amostra¹²¹.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse estudo foi pioneiro em realizar a avaliação taxonômica do microbioma intestinal em uma amostra constituída exclusivamente por brasileiros saudáveis, por meio da técnica de sequenciamento genético de alto rendimento, *shallow shotgun*, com identificação a nível de filo, classe e gênero. A avaliação nutricional e dietética fornece informações sobre hábitos alimentares da população brasileira, relevantes no contexto do estudo, diante da grande influência da dieta na composição microbiana. A inclusão de informações quanto ao histórico médico prévio e hábitos de vida permitiram também uma melhor caracterização da amostra.

A pequena amostra utilizada e o desenho transversal são limitações do estudo. Além disso, a falta de informações taxonômicas a nível de espécie e cepas, bem como do estudo dos metabólitos bacterianos limitam a melhor caracterização do microbioma. Entretanto, esse estudo pode contribuir para o conhecimento do microbioma intestinal em indivíduos saudáveis, fornecendo informações sobre a amostra analisada. A grande maioria das pesquisas nesse campo é realizada em outros países. Diante da variabilidade de microbioma encontrado em diferentes regiões geográficas, é ainda mais relevante o estudo de microbioma no Brasil, pois apresenta uma combinação de extensa distribuição demográfica com diversidade de climas, dietas e costumes. Pelo mesmo motivo, essa grande variedade limita a generalização dos achados do nosso estudo para toda a população brasileira e pode explicar as diferenças em relação a outros estudos nacionais.

A homogeneidade quanto ao sexo dos indivíduos, ausência de extremos de IMC e idade e o fato de incluir população urbana em sua totalidade contribuíram para uma coorte mais similar, contudo não necessariamente geneticamente homogênea, haja visto a característica miscigenação brasileira. A utilização de critérios de seleção e exclusão semelhantes a de grandes estudos internacionais, como o HMP, minimiza a influência de fatores com maior potencial de alterar o microbioma intestinal e permite comparar os resultados obtidos.

Os dados gerados pela avaliação metagenômica por *shotgun* podem ainda ser utilizados para pesquisas futuras, uma vez que as amostras fecais foram colhidas e armazenadas em duplicata. O estudo por meio do *shallow shotgun* pode permitir a identificação de genes específicos, como os envolvidos em resistência antimicrobiana,

fornecer informações relevantes sobre microrganismos resistentes na população brasileira sadia, estudar populações bacterianas específicas e traçar seu perfil patogênico ou não.

REFERÊNCIAS

1. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31. doi:10.1186/s40168-015-0094-5
2. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(1):55-71. doi:10.1038/s41579-020-0433-9
3. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312(5778):1355-1359. doi:10.1126/science.1124234
4. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016;14(8):e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533
5. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 2016;8(1):51. doi:10.1186/s13073-016-0307-y
6. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-214. doi:10.1038/nature11234
7. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017;279(1):70-89. doi:10.1111/imr.12567
8. Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat Rev Genet*. 2017;18(11):690-699. doi:10.1038/nrg.2017.63
9. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014;159(4):789-799. doi:10.1016/j.cell.2014.09.053
10. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603. doi:10.1038/35079107
11. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):1035S-1045S. doi:10.1093/ajcn/69.5.1035s
12. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):690-703. doi:10.1016/j.chom.2015.04.004
13. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body

- habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11971-11975. doi:10.1073/pnas.1002601107
14. Lynch S V, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2369-2379. doi:10.1056/NEJMra1600266
 15. Khosravi A, Mazmanian SK. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(2):221-227. doi:10.1016/j.mib.2013.03.009
 16. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med*. 2014;20(2):159-166. doi:10.1038/nm.3444
 17. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol*. 2013;14(7):676-684. doi:10.1038/ni.2640
 18. Burcelin R, Serino M, Chabo C, et al. Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15 Suppl 3:61-70. doi:10.1111/dom.12157
 19. Hilty M, Burke C, Pedro H, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*. 2010;5(1):e8578. doi:10.1371/journal.pone.0008578
 20. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019;7(1). doi:10.3390/microorganisms7010014
 21. Ruan W, Engevik MA, Spinler JK, Versalovic J. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Dig Dis Sci*. 2020;65(3):695-705. doi:10.1007/s10620-020-06118-4
 22. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*. 2011;6(6):e21313. doi:10.1371/journal.pone.0021313
 23. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-573. doi:10.1126/science.1241165
 24. David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559-563. doi:10.1038/nature12820
 25. Leeming ER, Johnson AJ, Spector TD, Le Roy CI. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients*. 2019;11(12).

doi:10.3390/nu11122862

26. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*. 2014;63(12):1913-1920. doi:10.1136/gutjnl-2013-306541
27. Liu B-N, Liu X-T, Liang Z-H, Wang J-H. Gut microbiota in obesity. *World J Gastroenterol*. 2021;27(25):3837-3850. doi:10.3748/wjg.v27.i25.3837
28. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-11075. doi:10.1073/pnas.0504978102
29. 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):1027-1031. doi:10.1038/nature05414
30. Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I, et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathog*. 2013;5(1):10. doi:10.1186/1757-4749-5-10
31. Muscogiuri G, Cantone E, Cassarano S, et al. Gut microbiota: a new path to treat obesity. *Int J Obes Suppl*. 2019;9(1):10-19. doi:10.1038/s41367-019-0011-7
32. Geng J, Ni Q, Sun W, Li L, Feng X. The links between gut microbiota and obesity and obesity related diseases. *Biomed Pharmacother*. 2022;147:112678. doi:10.1016/j.biopha.2022.112678
33. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):120. doi:10.1186/s12866-017-1027-1
34. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2365-2370. doi:10.1073/pnas.0812600106
35. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-1023. doi:10.1038/4441022a
36. Indiani CMDSP, Rizzardi KF, Castelo PM, Ferraz LFC, Darrieux M, Parisotto TM. Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Child Obes*. 2018;14(8):501-509. doi:10.1089/chi.2018.0040
37. Huang C, Shi G. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *J Transl Med*. 2019;17(1):225. doi:10.1186/s12967-019-1971-7

38. Sapkota AR, Berger S, Vogel TM. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. *Environ Health Perspect.* 2010;118(3):351-356. doi:10.1289/ehp.0901201
39. Morris A, Beck JM, Schloss PD, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(10):1067-1075. doi:10.1164/rccm.201210-1913OC
40. Patangia D V, Anthony Ryan C, Dempsey E, Paul Ross R, Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen.* 2022;11(1):e1260. doi:10.1002/mbo3.1260
41. Weersma RK, Zhernakova A, Fu J. Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut.* 2020;69(8):1510-1519. doi:10.1136/gutjnl-2019-320204
42. Bruno G, Zaccari P, Rocco G, et al. Proton pump inhibitors and dysbiosis: Current knowledge and aspects to be clarified. *World J Gastroenterol.* 2019;25(22):2706-2719. doi:10.3748/wjg.v25.i22.2706
43. Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut.* 2016;65(5):740-748. doi:10.1136/gutjnl-2015-310376
44. McDonald EG, Milligan J, Frenette C, Lee TC. Continuous Proton Pump Inhibitor Therapy and the Associated Risk of Recurrent Clostridium difficile Infection. *JAMA Intern Med.* 2015;175(5):784-791. doi:10.1001/jamainternmed.2015.42
45. Janarthanan S, Ditah I, Adler DG, Ehrinpreis MN. Clostridium difficile-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(7):1001-1010. doi:10.1038/ajg.2012.179
46. Leonard J, Marshall JK, Moayyedi P. Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(9):2047-2056; quiz 2057. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01275.x
47. Zhang Q, Hu N. Effects of Metformin on the Gut Microbiota in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:5003-5014. doi:10.2147/DMSO.S286430
48. Gibson CM, Childs-Kean LM, Naziruddin Z, Howell CK. The alteration of the gut microbiome by immunosuppressive agents used in solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis an Off J Transplant Soc.* 2021;23(1):e13397. doi:10.1111/tid.13397
49. Gabarre P, Loens C, Tamzali Y, Barrou B, Jaisser F, Tourret J. Immunosuppressive therapy after solid organ transplantation and the gut microbiota: Bidirectional interactions with clinical consequences. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2022;22(4):1014-1030. doi:10.1111/ajt.16836

50. Pop M, Walker AW, Paulson J, et al. Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition. *Genome Biol.* 2014;15(6):R76. doi:10.1186/gb-2014-15-6-r76
51. Quin C, Gibson DL. Human behavior, not race or geography, is the strongest predictor of microbial succession in the gut bacteriome of infants. *Gut Microbes.* 2020;11(5):1143-1171. doi:10.1080/19490976.2020.1736973
52. de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut.* 2022;71(5):1020-1032. doi:10.1136/gutjnl-2021-326789
53. Leite GGS, Weitsman S, Parodi G, et al. Mapping the Segmental Microbiomes in the Human Small Bowel in Comparison with Stool: A REIMAGINE Study. *Dig Dis Sci.* 2020;65(9):2595-2604. doi:10.1007/s10620-020-06173-x
54. Barlow JT, Leite G, Romano AE, et al. Quantitative sequencing clarifies the role of disruptor taxa, oral microbiota, and strict anaerobes in the human small-intestine microbiome. *Microbiome.* 2021;9(1):214. doi:10.1186/s40168-021-01162-2
55. Seekatz AM, Schnizlein MK, Koenigskecht MJ, et al. Spatial and Temporal Analysis of the Stomach and Small-Intestinal Microbiota in Fasted Healthy Humans. *mSphere.* 2019;4(2). doi:10.1128/mSphere.00126-19
56. Ko H-J, Chang S-Y. Regulation of intestinal immune system by dendritic cells. *Immune Netw.* 2015;15(1):1-8. doi:10.4110/in.2015.15.1.1
57. Cai R, Cheng C, Chen J, Xu X, Ding C, Gu B. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the mucus layer in the colon. *Gut Microbes.* 2020;11(4):680-690. doi:10.1080/19490976.2020.1735606
58. Martinez KB, Leone V, Chang EB. Microbial metabolites in health and disease: Navigating the unknown in search of function. *J Biol Chem.* 2017;292(21):8553-8559. doi:10.1074/jbc.R116.752899
59. Riva A, Borgo F, Lassandro C, et al. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ Microbiol.* 2017;19(1):95-105. doi:10.1111/1462-2920.13463
60. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006;124(4):837-848. doi:10.1016/j.cell.2006.02.017
61. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science.* 2015;348(6230):80-86. doi:10.1126/science.aaa4972
62. Shanahan F, Ghosh TS, O'Toole PW. The Healthy Microbiome-What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome? *Gastroenterology.* 2021;160(2):483-494. doi:10.1053/j.gastro.2020.09.057

63. Virgin HW. The virome in mammalian physiology and disease. *Cell*. 2014;157(1):142-150. doi:10.1016/j.cell.2014.02.032
64. Reyes A, Haynes M, Hanson N, et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*. 2010;466(7304):334-338. doi:10.1038/nature09199
65. Wang J, Gao Y, Zhao F. Phage-bacteria interaction network in human oral microbiome. *Environ Microbiol*. 2016;18(7):2143-2158. doi:10.1111/1462-2920.12923
66. Lukeš J, Stensvold CR, Jirků-Pomajbíková K, Wegener Parfrey L. Are Human Intestinal Eukaryotes Beneficial or Commensals? *PLoS Pathog*. 2015;11(8):e1005039. doi:10.1371/journal.ppat.1005039
67. Rossen NG, Bart A, Verhaar N, et al. Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2015;34(5):1039-1044. doi:10.1007/s10096-015-2312-2
68. Loke P, Lim YAL. Helminths and the microbiota: parts of the hygiene hypothesis. *Parasite Immunol*. 2015;37(6):314-323. doi:10.1111/pim.12193
69. Huffnagle GB, Noverr MC. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol*. 2013;21(7):334-341. doi:10.1016/j.tim.2013.04.002
70. Underhill DM, Iliev ID. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):405-416. doi:10.1038/nri3684
71. Qin Q, Yan S, Yang Y, et al. A Metagenome-Wide Association Study of the Gut Microbiome and Metabolic Syndrome. *Front Microbiol*. 2021;12:682721. doi:10.3389/fmicb.2021.682721
72. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol*. 2014;16(7):1024-1033. doi:10.1111/cmi.12308
73. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 2013;341(6141):1237439. doi:10.1126/science.1237439
74. Liu R, Hong J, Xu X, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*. 2017;23(7):859-868. doi:10.1038/nm.4358
75. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*. 2012;12(5):611-622. doi:10.1016/j.chom.2012.10.012
76. Pedersen H, Guðmundsdóttir V, Nielsen H, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016;535.

doi:10.1038/nature18646

77. Kong HH, Oh J, Deming C, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res.* 2012;22(5):850-859. doi:10.1101/gr.131029.111
78. Huttenhower C, Kostic AD, Xavier RJ. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity.* 2014;40(6):843-854. doi:10.1016/j.immuni.2014.05.013
79. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe.* 2015;17(2):260-273. doi:10.1016/j.chom.2015.01.001
80. Statnikov A, Alekseyenko A V, Li Z, et al. Microbiomic signatures of psoriasis: feasibility and methodology comparison. *Sci Rep.* 2013;3:2620. doi:10.1038/srep02620
81. Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Chapter 1 – Normal Indigenous Intestinal Flora. In: ; 1983.
82. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet.* 2019;20(6):341-355. doi:10.1038/s41576-019-0113-7
83. Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(9):3336-3345. doi:10.1128/AEM.64.9.3336-3345.1998
84. Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(11):4799-4807. doi:10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999
85. Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrrie E, Flint HJ. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002;39(1):33-39. doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00904.x
86. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005;308(5728):1635-1638. doi:10.1126/science.1110591
87. Durazzi F, Sala C, Castellani G, Manfreda G, Remondini D, De Cesare A. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Sci Rep.* 2021;11(1):3030. doi:10.1038/s41598-021-82726-y
88. Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, et al. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science.* 2005;308(5721):554-557.

- doi:10.1126/science.1107851
89. Joice R, Yasuda K, Shafquat A, Morgan XC, Huttenhower C. Determining microbial products and identifying molecular targets in the human microbiome. *Cell Metab.* 2014;20(5):731-741. doi:10.1016/j.cmet.2014.10.003
 90. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65. doi:10.1038/nature08821
 91. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature.* 2017;550(7674):61-66. doi:10.1038/nature23889
 92. Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science.* 2012;336(6086):1255-1262. doi:10.1126/science.1224203
 93. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res an Int J rapid Publ reports genes genomes.* 2007;14(4):169-181. doi:10.1093/dnares/dsm018
 94. Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol.* 2018;3(1):8-16. doi:10.1038/s41564-017-0072-8
 95. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174-180. doi:10.1038/nature09944
 96. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457(7228):480-484. doi:10.1038/nature07540
 97. Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature.* 2012;486(7402):215-221. doi:10.1038/nature11209
 98. McGuire AL, Colgrove J, Whitney SN, Diaz CM, Bustillos D, Versalovic J. Ethical, legal, and social considerations in conducting the Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2008;18(12):1861-1864. doi:10.1101/gr.081653.108
 99. Pinheiro ABV, Lacerda EM de A, Benzecry EH, Gomes MC da S, Costa VM da. *Tabela Para Avaliação de Consumo Alimentar Em Medidas Caseiras.* 5th ed. Atheneu; 2005. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-927080>
 100. Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação - NEPA. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO.* 4th ed. Universidade Estadual de Campinas; 2011. <https://www.gov.br/agricultura/pt->

br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-de-produtos-origem-vegetal/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/tabela-brasileira-de-composicao-de-alimentos_taco_2011.pdf

101. Food Research Center (FoRC). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA) v7.2. Universidade de São Paulo (USP). Published 2023. Accessed January 21, 2023. <http://www.fcf.usp.br/tbca>
102. Agricultural Research Service. FoodData Central. U.S. Department of Agriculture. Published 2019. Accessed January 22, 2023. <https://fdc.nal.usda.gov/>
103. Monteiro CA, Cannon G, Moubarac J-C, Levy RB, Louzada MLC, Jaime PC. The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. *Public Health Nutr.* 2018;21(1):5-17. doi:10.1017/S1368980017000234
104. Brasil - Ministério da saúde. *Guia Alimentar Para a População Brasileira Guia Alimentar Para a População Brasileira.*; 2014.
105. Andrade SC de, Previdelli ÁN, Marchioni DML, Fisberg RM. Evaluation of the reliability and validity of the Brazilian Healthy Eating Index Revised. *Rev Saude Publica.* 2013;47(4):675-683. doi:10.1590/S0034-8910.2013047004267
106. Previdelli ÁN, Andrade SC de, Pires MM, Ferreira SRG, Fisberg RM, Marchioni DM. Índice de Qualidade da Dieta Revisado para população brasileira. *Rev Saude Publica.* 2011;45.
107. Mullard A. 2022 FDA approvals. *Nat Rev Drug Discov.* 2023;22(2):83-88. doi:10.1038/d41573-023-00001-3
108. La Rosa PS, Brooks JP, Deych E, et al. Hypothesis testing and power calculations for taxonomic-based human microbiome data. *PLoS One.* 2012;7(12):e52078. doi:10.1371/journal.pone.0052078
109. Blount K, Jones C, Walsh D, Gonzalez C, Shannon WD. Development and Validation of a Novel Microbiome-Based Biomarker of Post-antibiotic Dysbiosis and Subsequent Restoration. *Front Microbiol.* 2021;12:781275. doi:10.3389/fmicb.2021.781275
110. Kim B-R, Shin J, Guevarra R, et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(12):2089-2093. doi:10.4014/jmb.1709.09027
111. Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, et al. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2013;27(3):1012-1022. doi:10.1096/fj.12-220806
112. Pires RK, Luft VC, Araújo MC, et al. Análise crítica do índice de qualidade da

- dieta revisado para a população brasileira (IQD-R): aplicação no ELSA-Brasil. *Cien Saude Colet.* 2020;25.
113. Newby PK, Hu FB, Rimm EB, et al. Reproducibility and validity of the Diet Quality Index Revised as assessed by use of a food-frequency questionnaire. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(5):941-949. doi:10.1093/ajcn/78.5.941
 114. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(11):1621-1630. doi:10.1016/s0002-8223(02)90346-9
 115. Padovani RM, Amaya-Farfán J, Colugnati FAB, Domene SMÁ. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Rev Nutr.* 2006;19.
 116. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Coordenação de Trabalho e Rendimento. *Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Análise Do Consumo Alimentar Pessoal No Brasil.*; 2011. <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>
 117. Louzada ML da C, Ricardo CZ, Steele EM, Levy RB, Cannon G, Monteiro CA. The share of ultra-processed foods determines the overall nutritional quality of diets in Brazil. *Public Health Nutr.* 2018;21(1):94-102. doi:10.1017/S1368980017001434
 118. Pan American Health Organization. *Nutrient Profile Model.* (PAHO, ed.); 2015. http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/18621/9789275118733_eng.pdf
 119. Louzada ML da C, Baraldi LG, Steele EM, et al. Consumption of ultra-processed foods and obesity in Brazilian adolescents and adults. *Prev Med (Baltim).* 2015;81:9-15. doi:10.1016/j.ypmed.2015.07.018
 120. D'Avila HF, Kirsten VR. Consumo energético proveniente de alimentos ultraprocesados por adolescentes. *Rev Paul Pediatr.* 2017;35.
 121. Cronin P, Joyce SA, O'Toole PW, O'Connor EM. Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients.* 2021;13(5). doi:10.3390/nu13051655
 122. Higuchi BS, Rodrigues N, Gonzaga MI, et al. Intestinal Dysbiosis in Autoimmune Diabetes Is Correlated With Poor Glycemic Control and Increased Interleukin-6: A Pilot Study. *Front Immunol.* 2018;9:1689. doi:10.3389/fimmu.2018.01689
 123. Baima DC. Avaliação da microbiota intestinal em pacientes com DRGE erosiva e em controles saudáveis assintomáticos. Published online December 9, 2020. doi:10.11606/T.5.2020.tde-01072021-115140
 124. Duarte SMB, Stefano JT, Miele L, et al. Gut microbiome composition in lean

- patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2018;28(4):369-384. doi:10.1016/j.numecd.2017.10.014
125. Rossi EM, Chielle EO, Honorato JFB, Bertolini C, Marconatto L. Gut microbiota of obese individuals and their relation with the onset of obesity / Microbiota intestinal de indivíduos obesos e a sua relação com o início da obesidade. *Brazilian J Dev.* 2022;8(1):1921-1937. doi:10.34117//bjdv8n1-123
 126. Liu X, Mao B, Gu J, et al. Blautia-a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes.* 2021;13(1):1-21. doi:10.1080/19490976.2021.1875796
 127. Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobetti M, De Angelis M. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms.* 2020;8(4). doi:10.3390/microorganisms8040573
 128. Gu X, Sim JXY, Lee WL, et al. Gut Ruminococcaceae levels at baseline correlate with risk of antibiotic-associated diarrhea. *iScience.* 2022;25(1):103644. doi:10.1016/j.isci.2021.103644
 129. Leylabadlo HE, Ghotaslou R, Feizabadi MM, et al. The critical role of Faecalibacterium prausnitzii in human health: An overview. *Microb Pathog.* 2020;149:104344. doi:10.1016/j.micpath.2020.104344
 130. Zafar H, Saier MHJ. Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1-20. doi:10.1080/19490976.2020.1848158
 131. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus Alistipes: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front Immunol.* 2020;11:906. doi:10.3389/fimmu.2020.00906
 132. O'Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front Microbiol.* 2016;7:925. doi:10.3389/fmicb.2016.00925
 133. Luo Y, Lan C, Li H, et al. Rational consideration of Akkermansia muciniphila targeting intestinal health: advantages and challenges. *NPJ biofilms microbiomes.* 2022;8(1):81. doi:10.1038/s41522-022-00338-4
 134. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut.* 2016;65(3):426-436. doi:10.1136/gutjnl-2014-308778
 135. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front Microbiol.* 2017;8:1162. doi:10.3389/fmicb.2017.01162

136. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(1):20-32. doi:10.1038/nrmicro3552
137. Nishijima S, Suda W, Oshima K, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res an Int J rapid Publ reports genes genomes.* 2016;23(2):125-133. doi:10.1093/dnares/dsw002
138. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490(7418):55-60. doi:10.1038/nature11450
139. Qin N, Yang F, Li A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature.* 2014;513(7516):59-64. doi:10.1038/nature13568
140. Feng Q, Liang S, Jia H, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun.* 2015;6:6528. doi:10.1038/ncomms7528
141. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013;500(7464):541-546. doi:10.1038/nature12506
142. Li J, Jia H, Cai X, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):834-841. doi:10.1038/nbt.2942
143. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature.* 2013;498(7452):99-103. doi:10.1038/nature12198
144. Tyakht A V, Kostyukova ES, Popenko AS, et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun.* 2013;4:2469. doi:10.1038/ncomms3469
145. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012;486(7402):222-227. doi:10.1038/nature11053
146. Obregon-Tito AJ, Tito RY, Metcalf J, et al. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat Commun.* 2015;6:6505. doi:10.1038/ncomms7505
147. Clemente JC, Pehrsson EC, Blaser MJ, et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv.* 2015;1(3). doi:10.1126/sciadv.1500183
148. King CH, Desai H, Sylvetsky AC, et al. Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLoS One.* 2019;14(9):e0206484. doi:10.1371/journal.pone.0206484
149. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A

Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9351507. doi:10.1155/2017/9351507

150. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* 2020;30(6):492-506. doi:10.1038/s41422-020-0332-7
151. Hajjo R, Sabbah DA, Al Bawab AQ. Unlocking the Potential of the Human Microbiome for Identifying Disease Diagnostic Biomarkers. *Diagnostics (Basel, Switzerland).* 2022;12(7). doi:10.3390/diagnostics12071742
152. Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, Michalik M. The Many Faces of Enterococcus spp.-Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms.* 2021;9(9). doi:10.3390/microorganisms9091900
153. Konopiński MK. Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ.* 2020;8:e9391. doi:10.7717/peerj.9391

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você, , foi selecionado para participar de um projeto de pesquisa que tem como objetivo identificar os microorganismos constituintes da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis. Sua participação neste estudo é voluntária, gratuita e não haverá qualquer tipo de remuneração. O anonimato será mantido em todas as etapas e você poderá se recusar a participar deste estudo a qualquer momento.

A inclusão no estudo será realizada após confirmação de que o participante é saudável. Para tanto, será realizada entrevista e aplicação de um questionário para avaliar hábitos de vida e estado geral de saúde. Serão, ainda, coletadas amostras de sangue para exclusão de infecções por HIV e vírus de hepatite B e C. No caso das mulheres, excluindo aquelas submetidas a método cirúrgico anticonceptivo há mais de 6 meses, também será realizada a dosagem de beta-HCG sérico com objetivo de excluir gestação atual. Caso não apresentem restrições à participação no estudo, serão coletadas amostras de fezes e, posteriormente, encaminhadas para estudo genético da população bacteriana em laboratório de referência nos Estados Unidos da América. As amostras de fezes vão ser armazenadas no Banco de Tumores e Tecidos do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG e podem ser utilizadas para estudos futuros.

O benefício esperado com este estudo é identificar o padrão de microorganismos presentes em indivíduos saudáveis. Os riscos associados à pesquisa estariam associados a eventual desconforto ou constrangimento em responder às perguntas. Para evitar esses possíveis riscos, as informações coletadas serão mantidas em sigilo até a publicação dos resultados, e para evitar constrangimentos, a abordagem para responder as perguntas será realizada de maneira discreta, preservando a individualidade de cada um. Outra possível complicação resulta da punção venosa, que poderá trazer dor ou inflamação na veia, contudo essas são auto-limitadas e não exigem tratamento específico.

Eu, , li o texto acima e compreendi o estudo ao qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou

livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem qualquer ônus.

Eu, , aceito participar do estudo e concordo que as informações e amostras de sangue e fezes coletadas sejam utilizadas neste projeto de pesquisa.

O participante, ao aceitar fazer parte desta pesquisa, receberá uma via deste documento com o mesmo conteúdo.

Nome completo do participante:

Assinatura: Data:

Em caso de dúvidas com respeito à pesquisa, você poderá consultar:

Instituto Alfa de Gastroenterologia - Av. Professor Alfredo Balena, 110 – 2o andar ala oeste

CEP: 30130-100 / Belo Horizonte – MG / Telefones: 31 33079251 ou 31 330794

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2o andar - Sala 2005. Campus Pam-

pulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592

Número do documento:

APÊNDICE B - Questionário de hábitos de vida e histórico médico

- Ocupação:
- Fumante: não / sim - Nº cigarros/dia:
- Horas de sono por dia (em média):
- Atividade física: não / sim - frequência:
- Presença de animais de estimação ou animais de fazenda em seu ambiente: não / sim - Especifique:
- Viagens realizadas nos últimos 6 meses: não / sim - Especifique:

Dieta:

- Tipo de dieta: Variada / Vegetariana / Outro - Especifique:
- Restrições alimentares: Lactose / Glúten / Outros:
- Mudança alimentar nos últimos 6 meses: Não / Sim - Especifique:
- Modificações significativas de peso nos últimos 3 meses: Não / sim - Especifique:

Histórico médico prévio:

- Doenças diagnosticadas nos últimos seis meses:
 - História de doenças respiratórias: não / sim - Especifique:
 - História de doenças hematológicas: não / sim - Especifique:
 - História de doenças hepáticas: não / sim - Especifique:
 - História de doenças renais: não / sim - Especifique:
 - História de doenças urogenitais: não / sim - Especifique:
 - História de alergias: não / sim - Especifique:
 - História de doenças gastrointestinais:
 - a) Inflamação intestinal crônica (por ex. doença celíaca, retocolite ulcerativa, doença de Crohn), síndrome do intestino irritável: não / sim - Especifique:
 - b) Gastroenterite infecciosa, colite ou gastrite, diarreia crônica ou persistente de origem desconhecida, infecção recorrente por *Clostridioides difficile* ou infecção por *Helicobacter pylori* não tratada: não / sim - Especifique:
 - c) Constipação intestinal crônica: não / sim.
 - d) Existência de pólipos ou massas gastrointestinais, displasia ou câncer: não / sim - Especifique:
- Cirurgias do trato gastrointestinal nos últimos 5 anos: não / sim - Especifique:

- Cirurgia de remoção do apêndice: não / sim - data

História gestacional (apenas mulheres):

- Gravidez atual: não / sim
- Lactante: não / sim
- Número de gestações a termo:

Medicações (nos últimos 6 meses):

- Medicação de uso crônico: não / sim - Especifique:
- Medicação de uso eventual: não / sim - Especifique:
- Medicação homeopática: não / sim
- Uso prévio de probióticos ou prebióticos: não / sim - dose:
- Uso regular de inibidores de bombas de prótons: não / sim
- Uso de drogas imunossupressoras (incluindo prednisona com dose igual ou superior a 20mg/dia por período superior a 30 dias): não / sim
- Uso prévio de metformina: não / sim
- Uso de antibióticos ou antiparasitários nos últimos 3 meses: não / sim

APÊNDICE C - Banco de dados completo da avaliação dietética

Kcal	Kcal/kg	CH O_g	CH O_%	PT N_g	PT N_%	LIP_g	LIP_%	Sa t_g	Mon o_g	Pol i_g	Col_mg	Fib _g	IQ D-R	Kcal _G1	%_ G1	Kcal _G2	%_ G2	Kcal _G3	%_ G3	Kcal _G4	%_ G4
931	11,94	55,72	23,94	90,33	38,81	41,00	39,63	22,41	4,06	6,00	241,51	7,57	61,30	522	56,02	71	7,60	339	36,41	0	0,00
1653	24,67	140,71	34,05	135,95	32,90	60,18	32,77	23,64	16,42	7,93	913,10	20,83	79,49	1240	74,99	72	4,37	64	3,88	277	16,78
1627	23,75	275,08	67,63	51,65	12,70	48,42	26,78	19,81	4,01	6,37	39,77	44,40	76,98	815	50,11	71	4,35	121	7,42	620	38,12
1599	22,21	106,82	26,72	131,02	32,78	78,19	44,01	19,68	21,26	29,04	449,60	9,70	71,37	1234	77,17	71	4,42	117	7,32	177	11,07
1431	25,11	159,53	44,59	77,23	21,59	54,31	34,16	23,06	15,47	8,71	270,02	16,64	61,31	425	29,70	130	9,11	876	61,18	0	0,00
1479	21,43	184,88	50,00	39,66	10,73	64,89	39,48	21,94	18,68	11,71	40,30	19,89	63,46	801	54,14	71	4,78	225	15,21	382	25,85
2166	33,84	212,68	39,28	85,76	15,84	108,77	45,19	38,17	30,62	19,28	209,36	21,53	63,42	860	39,71	165	7,61	926	42,75	215	9,93
3080	34,22	324,17	42,10	200,21	26,00	112,24	32,80	42,73	26,77	18,61	165,53	28,79	86,48	2001	64,96	85	2,77	479	15,54	515	16,73
1663	21,88	120,84	29,07	137,26	33,02	74,27	40,20	19,63	17,03	16,31	618,00	19,73	73,25	1215	73,04	71	4,25	195	11,71	183	11,00
1535	18,54	195,36	50,91	66,80	17,41	55,87	32,76	16,72	8,02	10,24	72,40	20,33	78,73	648	42,23	74	4,81	320	20,85	493	32,12
2707	39,06	319,43	47,20	77,15	11,40	127,61	42,43	35,81	25,67	41,99	360,70	55,15	57,24	1513	55,90	71	2,61	690	25,49	433	16,00
1346	15,47	126,16	37,49	74,22	22,06	58,81	39,32	26,73	14,14	7,92	724,43	7,28	57,02	481	35,70	71	5,25	433	32,17	362	26,89
2679	35,48	367,77	54,91	119,65	17,86	76,50	25,70	30,31	24,13	16,86	229,43	19,91	76,77	1410	52,64	71	2,64	361	13,48	837	31,25
3273	40,91	491,62	60,08	110,75	13,53	78,41	21,56	28,49	17,02	14,63	239,99	21,63	50,85	1808	55,23	71	2,16	50	1,51	1345	41,09
1161	21,11	148,40	51,13	77,94	26,85	28,58	22,15	8,30	7,68	8,99	159,39	18,19	82,76	612	52,74	71	6,09	150	12,92	328	28,23
1346	16,84	104,31	30,97	79,47	23,60	67,99	45,43	22,69	6,22	5,66	211,89	14,75	73,38	402	29,83	74	5,48	752	55,81	101	7,52
1758	21,18	215,07	48,94	84,20	19,16	61,24	31,35	22,57	17,54	6,50	185,39	8,01	60,33	1173	66,71	100	5,67	300	17,06	186	10,58
2508	28,83	352,05	56,15	69,68	11,11	89,39	32,08	28,02	15,65	10,73	204,30	36,27	72,38	1325	52,83	109	4,36	90	3,57	984	39,24
1930	21,69	220,22	45,64	116,12	24,07	67,52	31,49	15,65	15,41	15,32	255,63	34,33	81,78	1262	65,37	75	3,90	509	26,39	84	4,35
2411	29,62	338,10	56,09	81,98	13,60	82,75	30,89	33,23	18,25	14,98	304,63	27,95	67,39	1028	42,63	75	3,13	520	21,57	788	32,68
1907	22,98	190,26	39,91	44,31	9,29	78,36	36,98	27,03	24,94	15,66	107,38	14,46	52,39	427	22,40	227	11,90	341	17,90	912	47,81
963	10,70	90,55	37,61	82,10	34,10	28,96	27,07	10,94	8,90	5,70	241,55	7,22	70,03	793	82,38	71	7,34	99	10,28	0	0,00
728	9,27	46,82	25,72	52,25	28,71	35,90	44,38	15,72	15,77	7,60	460,67	10,05	60,86	393	54,02	71	9,71	99	13,59	165	22,65

25 48	25, 48	249 ,69	39,2 0	83, 95	13,1 8	79, 74	28, 17	21, 15	25,3 4	13, 48	248, 59	6,5 5	42, 01	270	10, 60	71	2,7 8	972	38, 15	123 6	48, 49
12 24	17, 54	110 ,91	36,2 4	78, 35	25,6 1	52, 87	38, 87	19, 66	14,5 4	10, 76	798, 23	12, 96	77, 76	838	68, 49	71	5,7 8	251	20, 54	63	5,1 7
12 80	21, 33	172 ,82	54,0 1	38, 78	12,1 2	50, 75	35, 68	13, 72	11,7 4	9,0 7	127, 58	7,3 1	67, 05	95	7,4 4	147	11, 49	627	48, 98	411	32, 08
95 3	16, 72	156 ,48	65,6 8	43, 60	18,3 0	20, 35	19, 22	5,1 5	7,09	6,8 9	110, 02	20, 83	82, 62	541	56, 74	135	14, 18	41	4,3 2	236	24, 76
13 03	25, 55	139 ,29	42,7 6	43, 37	13,3 1	67, 82	46, 84	17, 80	18,1 2	17, 11	518, 53	15, 03	69, 86	585	44, 91	71	5,4 3	258	19, 79	389	29, 85
26 18	37, 67	368 ,19	56,2 6	84, 66	12,9 4	91, 44	31, 44	34, 61	34,9 1	9,2 8	240, 25	12, 22	59, 92	901	34, 41	71	2,7 0	150	5,7 3	149 6	57, 14
29 29	37, 08	315 ,70	43,1 1	76, 43	10,4 4	123 ,62	37, 98	48, 49	32,9 8	16, 77	175, 69	24, 11	54, 82	535	18, 26	239	8,1 6	999	34, 11	115 6	39, 46
18 93	29, 58	291 ,51	61,6 0	95, 03	20,0 8	44, 94	21, 36	16, 88	10,6 7	10, 71	76,2 4	28, 17	67, 62	686	36, 25	111	5,8 5	568	30, 00	528	27, 90
22 24	25, 27	272 ,52	49,0 1	117 ,18	21,0 7	74, 76	30, 25	22, 49	20,9 3	25, 76	377, 78	22, 28	73, 89	133 9	60, 19	327	14, 71	558	25, 09	0	0,0 0
12 23	18, 82	139 ,46	45,6 1	70, 26	22,9 8	46, 73	34, 39	14, 34	14,6 8	11, 74	161, 58	19, 67	84, 32	847	69, 29	71	5,7 8	246	20, 09	59	4,8 1
10 30	15, 61	159 ,77	62,0 5	28, 55	11,0 9	32, 87	28, 72	9,8 5	10,0 9	7,3 7	24,6 1	10, 17	56, 57	130	12, 66	151	14, 63	49	4,8 0	699	67, 89
12 80	17, 07	97, 60	30,5 0	78, 17	24,4 3	63, 32	44, 53	14, 96	18,4 9	20, 06	110 2,23	11, 60	67, 59	966	75, 45	71	5,5 3	0	0,0 0	244	19, 06
25 90	36, 48	321 ,28	49,6 2	107 ,70	16,6 3	63, 07	21, 92	20, 03	18,7 7	18, 56	258, 19	28, 91	70, 16	115 1	44, 43	71	2,7 3	0	0,0 0	136 9	52, 85

**APÊNDICE D - Banco de dados completo da avaliação dietética
(micronutrientes)**

Fe_mg	Ca_mg	Mag_mg	Fós_mg	Na_mg	K_mg	Cob_mg	Zn_mg	Ret_mcg	Tia_mg	Rib_mg	Piri_mg	Nia_mg	VitC_mg
1,20	504,45	80,40	524,90	752,69	1396,10	0,23	2,21	0,00	0,34	0,00	0,15	19,83	51,63
11,96	655,18	235,02	1289,60	669,23	3168,27	0,82	23,60	70,20	0,49	0,68	0,19	8,46	182,77
7,98	436,68	224,55	598,23	1301,52	2284,08	0,97	5,28	22,04	0,95	0,35	0,36	2,93	161,04
5,97	256,38	181,92	1158,56	1353,52	2289,72	0,59	6,28	15,00	0,46	0,11	0,03	29,06	33,49
12,50	444,84	178,37	864,14	1824,22	1806,01	0,65	12,51	112,06	0,65	0,69	0,53	8,04	18,97
6,07	335,10	95,55	577,95	1976,82	1606,80	0,34	3,93	191,15	0,89	0,86	0,70	6,30	68,23
7,51	790,82	180,85	775,45	710,44	1746,12	0,55	4,89	345,85	0,82	1,44	0,19	11,90	110,08
30,30	1055,90	347,92	1196,47	1426,19	1855,79	105,82	28,26	893,85	2,30	2,69	1,82	26,90	100,12
5,85	310,60	230,70	734,50	1309,00	2044,50	0,63	5,58	94,00	0,94	0,43	0,76	13,47	95,00
2,73	1295,82	217,82	1061,88	2347,34	2306,87	0,56	6,46	198,62	0,69	2,72	0,63	16,11	11,89
6,46	130,55	174,21	920,36	1411,51	3090,90	0,90	6,00	118,30	1,51	1,20	1,32	20,83	84,28
5,00	486,80	104,30	720,70	853,60	983,10	0,55	3,60	242,00	0,70	0,47	0,27	40,51	6,56
10,24	769,37	224,02	1109,21	1993,76	2075,84	0,80	9,84	382,99	1,03	2,25	0,94	28,32	62,84
16,20	645,32	310,37	1257,62	4027,49	2372,40	0,98	16,76	334,03	1,12	1,44	1,80	43,18	33,10
4,79	401,27	180,11	958,12	1052,60	1835,36	0,49	4,94	69,40	0,79	0,76	0,47	44,71	31,55
5,41	1072,07	113,18	603,12	2045,90	1243,58	0,21	3,14	142,67	0,28	1,10	0,08	6,06	99,91
4,29	205,38	100,24	450,00	868,99	1211,01	0,25	5,28	70,62	0,59	1,10	0,86	6,73	0,00
6,08	161,70	171,47	565,78	1761,25	1612,08	0,99	6,52	15,97	4,17	0,19	0,17	13,06	35,72

8,33	361,68	283,09	1123,20	1555,48	3355,78	0,90	11,69	240,15	0,53	0,54	1,06	25,53	130,33
7,62	548,02	231,93	790,49	2016,72	2470,92	0,78	13,61	184,94	0,59	1,18	0,32	10,96	44,35
4,35	549,99	168,63	607,45	1118,35	1915,10	0,66	4,63	121,06	0,41	0,60	0,57	5,13	53,18
3,32	343,19	150,69	892,54	320,99	2010,24	0,30	5,75	35,70	0,62	0,30	0,24	40,01	48,62
8,41	442,80	93,47	711,75	633,70	861,94	0,32	6,84	218,80	0,48	0,40	0,00	4,47	14,64
3,03	788,56	250,37	993,42	4288,40	1837,70	0,41	4,56	197,24	0,48	1,11	3,31	81,52	87,84
10,39	584,53	142,31	1163,73	852,87	1609,65	9,30	10,43	10323,40	0,36	2,31	0,16	12,42	29,75
5,15	250,94	134,30	551,86	1531,71	1496,70	0,52	2,83	124,74	1,02	0,78	0,59	10,93	38,61
6,65	187,67	147,15	639,23	733,94	1413,21	0,48	3,47	36,94	0,78	0,81	0,22	2,48	91,41
7,48	282,53	200,28	810,78	671,43	1481,02	0,66	6,43	112,06	0,45	0,62	0,39	4,50	28,40
11,46	296,16	168,60	1065,52	1672,27	1578,58	0,75	15,78	141,49	0,82	1,17	1,38	10,53	13,33
5,63	1555,17	266,33	1292,35	2835,46	2198,66	0,69	8,52	355,84	2,38	1,20	2,51	40,66	95,18
18,30	971,77	186,57	1334,31	3241,03	2351,84	0,94	8,41	135,55	0,37	0,53	0,45	7,32	13,90
12,80	307,35	267,00	1238,96	1405,87	3386,72	1,08	12,82	205,17	0,60	1,13	0,30	45,17	69,14
7,20	552,19	179,01	761,46	1627,23	1826,29	0,69	16,04	871,33	0,69	0,77	0,21	13,45	212,87
8,54	387,07	121,98	444,15	894,69	983,97	0,41	3,58	41,37	0,91	1,20	0,39	3,05	75,58
13,18	334,53	115,58	1208,03	950,28	1026,92	0,43	9,34	189,83	0,20	0,66	0,01	3,39	0,40
11,43	851,52	344,52	1579,50	1343,05	3284,20	0,94	10,43	196,06	1,79	1,00	1,21	28,61	258,87