



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

JEANINE SCHÜTZ CARDOSO TEÓFILO

Perfil do microbioma intestinal humano com dados de metagenoma em brasileiros

Florianópolis

2021

Jeanine Schütz Cardoso Teófilo

Perfil do microbioma intestinal humano com dados de metagenoma em brasileiros

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Ilíada Rainha de Souza, Dra.

Coorientadora: Lia Kubelka de Carlos Back, Dra.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

TEÓFILO, Jeanine Schütz Cardoso
Perfil do microbioma intestinal humano com dados de
metagenoma em brasileiros / Jeanine Schütz Cardoso TEÓFILO ;
orientador, Iliada Rainha de SOUZA, coorientador, Lia
Kubelka de Carlos BACK, 2021.
192 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Microbioma
Intestinal Humano. 3. Metagenômica . 4. Shotgun. I. SOUZA,
Iliada Rainha de . II. BACK, Lia Kubelka de Carlos . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV.
Título.

Jeanine Schütz Cardoso Teófilo

Perfil do microbioma intestinal humano com dados de metagenoma em brasileiros

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Guilherme de Toledo, Dr
Universidade Federal de Santa Catarina

Liliane Costa Conteville, Dr.(a)
Embrapa Pecuária Sudeste

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Ilíada Rainha de Souza, Dr.(a)
Orientadora

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois me deu coragem, força e persistência para superar as minhas dificuldades e medos ao longo da vida adulta e me permitiu entender que seria capaz de desafios maiores.

À minha família que é meu lugar seguro, com quem posso contar em todo o momento. Foram, junto comigo, incansáveis e me permitiram a ausência necessária para completar este trabalho. Obrigada pela parceria de vida, meu marido, Andrey Teófilo. Juntos temos construído uma família que se ama, com nossos filhos Louise e Enrico, que nos dão muitas razões para continuarmos nos aprimorando e aprendendo.

Aos professores da UFSC que me acolheram, sem me conhecer, pois mantêm as portas e os corações abertos àqueles que se dispõem a trilhar o caminho do conhecimento. Em particular, agradeço à Profa. Dra. Andréa Marrero com quem troquei muitas mensagens e quem me apresentou à minha orientadora, já delineando um possível caminho a ser seguido. Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Iliada Rainha de Souza, foi a "ponte" fundamental para que tudo fosse possível. Agradeço à Profa. Dra. Yara Costa Netto Muniz por me acolher, diversas vezes, em aconselhamentos e conversas, assim como no LAPOGE/UFSC (Laboratório de Polimorfismos Genéticos), juntamente com a Profa. Dra. Juliana Dal-Ri Lindenau. Também, à Profa. Dra. Juliana por todas as análises estatísticas. Agradeço ao Prof. Guilherme de Toledo e Silva por me ajudar a entender que a ciência se faz "a muitas mãos".

À empresa parceira, Biogenetika, na pessoa da minha coorientadora Dra. Lia Kubelka de Carlos Back, que me desafiou a entrar no "mundo" dos estudos do microbioma intestinal. Além de disponibilizar o material utilizado por este trabalho, me orientou e permitiu meu crescimento e busca individual. Também a toda a equipe da Biogenetika que me acolheu em minhas observações iniciais.

À CAPES e à UFSC pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual seria muito mais difícil executar este estudo.

À todos os membros do LAPOGE, com quem tive o prazer de fazer parte no mesmo período de tempo, por compartilhar abertamente os conhecimentos individuais para o crescimento do grupo, principalmente à Mari, Clisten, Manuela, Bernardo, Leili, Amanda, Luan e Danton.

À minha colega Fernanda Luiza Ferrari, pois aceitou o desafio de realizar as análises de bioinformática e sem ela seria improvável finalizar este trabalho. Sua dedicação e comprometimento são admiráveis.

Aos meus colegas de turma de mestrado, muitos dos quais pesquisadores já brilhantes, que nos inspiram a sempre avançar. Em especial, à Sabrina Fernandes Cardoso, pesquisadora minuciosa e amiga querida, com quem compartilhei as aulas e os desafios encontrados durante o curso.

RESUMO

O microbioma humano engloba o complemento total dos genes microbianos, produtos gênicos e genomas da microbiota que habitam o corpo. Algumas das relações da microbiota com o hospedeiro já ficaram bem definidas pela literatura científica. Cada indivíduo parece carregar seu próprio conjunto, amplamente individual, de cepas microbianas, que são adquiridas no início da vida, diferem entre ambientes e populações e podem persistir por anos ou passar por transições relativamente rápidas. A composição do microbioma intestinal varia entre os indivíduos devido a fatores intrínsecos e extrínsecos do microbioma, relacionados tanto com o ambiente, como com fatores de estilo de vida e a genética do hospedeiro. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar o Microbioma Intestinal Humano (MIH) em uma amostra da população brasileira com características de estilo de vida urbano e industrializado, e, correlacionar com os fatores sexo, idade e IMC. Em cooperação técnica entre o LAPOGE-UFSC e o laboratório Biogenetika, realizamos as análises do MIH. Amostras de fezes foram coletadas de Abril/2018 a Abril/2020, imediatamente enviadas ao laboratório para extração de DNA e armazenamento. O DNA foi preparado seguindo protocolo padrão Illumina (NexSeq500), utilizando-se a tecnologia de sequenciamento Whole Genome Shotgun (WGS). Os dados de sequenciamento foram disponibilizados para análises de bioinformática. Participaram da pesquisa 85 indivíduos brasileiros adultos e idosos, sendo 26 homens e 59 mulheres, com IMC variando de desnutrição a obesidade. Todas as regiões brasileiras obtiveram representante. Os participantes possuem estilo de vida urbano, industrializado, sendo expostos a fatores como estresse, alimentação diversificada, água tratada, boas condições de saneamento básico, uso de medicamentos e antibióticos, dentre outros fatores característicos. Encontramos 11 filos bacterianos, sendo os mais abundantes Bacteroidetes, seguido por Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia. Relacionamos positivamente a elevação das Proteobactérias com a idade. Obtivemos a dominância dos gêneros *Bacteroides* seguido por *Prevotella* e *Alistipes*. Encontramos 8 gêneros bacterianos como núcleo do microbioma amostrado. Encontramos 357 espécies, sendo que 13 destas foram as mais abundantes e 11 atingiram alta prevalência. Encontramos espécies relacionadas aos táxons VANISH (Voláteis e/ou Associados Negativamente às Sociedades Industrializadas de Humanos), como as pertencentes ao gênero *Prevotella*. Avaliamos a Raridade havendo diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney. Na análise de diversidade beta, por Bray-Curtis, foi possível identificar os enterótipos *Prevotella copri* e *Bacteroidetes*. Propomos, para caracterizar a população brasileira caracterizada por esta amostra, o gênero *Bacteroides* como representante. Estas amostras fazem parte de um banco de dados, que está sendo montado com dados de metagenômica por Shotgun, portanto inédito na população brasileira.

Palavras-chave: Microbioma intestinal humano. Metagenômica. Shotgun.

ABSTRACT

The human microbiome encompasses the full complement of microbial genes, gene products, and microbiota genomes that inhabit the body. Some of the relationships between the microbiota and the host have already been well defined by the scientific literature. Everyone appears to carry its own, largely individual, set of microbial strains, which are acquired early in life, differ across environments and populations, and may persist for years or undergo relatively rapid transitions. The composition of the gut microbiome varies between individuals due to intrinsic and extrinsic factors of the microbiome, related to both the environment, lifestyle factors and the genetics of the host. This work was developed with the objective of characterizing the Human Intestinal Microbiome (HIM) in a sample of the Brazilian population with characteristics of urban and industrialized lifestyle, and to correlate with the factors sex, age and BMI. In technical cooperation between LAPOGE-UFSC and the Biogenetika laboratory, we performed the HIM analyses. Stool samples were collected from April/2018 to April/2020, immediately sent to the laboratory for DNA extraction and storage. DNA was prepared following standard Illumina protocol (NexSeq500), using Whole Genome Shotgun (WGS) sequencing technology. Sequencing data were made available for bioinformatics analyses. A total of 85 Brazilian, adults and elderly individuals, participated in the research, 26 men and 59 women, with BMI ranging from malnutrition to obesity. All Brazilian regions obtained a representative. Participants have an urban, industrialized lifestyle, being exposed to factors such as stress, diversified food, treated water, good sanitation conditions, use of medicines and antibiotics, among other characteristic factors. We found 11 bacterial phyla, the most abundant being Bacteroidetes, followed by Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia. We positively related the increase in Proteobacteria with age. We obtained the dominance of the *Bacteroides* genera followed by *Prevotella* and *Alistipes*. We found 8 bacterial genera as the core of the sampled microbiome. We found 357 species, 13 of which were the most abundant and 11 reached high prevalence. We found species related to VANISH taxa (Volatile and/or Negatively Associated with Human Industrialized Societies), such as those belonging to the genus *Prevotella*. We evaluated Rarity with a significant difference using the Mann-Whitney test. In the beta diversity analysis, by Bray-Curtis, it was possible to identify the enterotypes *Prevotella copri* and *Bacteroidetes*. We propose, to characterize the Brazilian population characterized by this sample, the genus *Bacteroides* as a representative. These samples are part of a database, which is being assembled with metagenomics data by Shotgun, therefore unprecedented in the Brazilian population.

Keywords: Human gut microbiome. Metagenomic. Shotgun.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O núcleo do microbioma humano e suas possíveis influências variáveis.....	23
Figura 2 - Diferenças na composição do microbioma nos diferentes locais anatômicos.....	25
Figura 3 - Representação da composição do microbioma intestinal humano.....	28
Figura 4 - Taxa enriquecido em vários nichos do corpo humano em diversas populações ao redor do mundo.....	31
Figura 5 - Transição gradual na composição do microbioma intestinal a partir de mudanças na estratégia de subsistência do hospedeiro.....	32
Figura 6 - Efeitos da imigração para os EUA na microbiota intestinal de indivíduos do sudeste da Ásia.....	36
Figura 7 - Serviços sistêmicos desempenhados pela microbiota intestinal.....	44
Figura 8 – Esquema dos serviços sistêmicos que se mostram alterados pela estrutura do microbioma da população industrializada.....	56
Figura 9 – Organograma da proposta dos papéis do microbioma intestinal na obesidade.....	57
Figura 10 – Esquema dos efeitos benéficos do uso de microrganismos e carboidratos não digeríveis na modulação da microbiota intestinal para um desfecho saudável.....	62
Figura 11 - Distribuição da abundância relativa por filos e por amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Indivíduos participantes do estudo divididos conforme seus Estados de residência.....	81
Gráfico 2 – Indivíduos participantes do estudo divididos por sexo.....	82
Gráfico 3 – Distribuição dos participantes do estudo divididos de acordo com a idade.....	83
Gráfico 4 - Distribuição dos participantes do estudo divididos de acordo com a Classificação Nutricional relacionada com o IMC.....	84
Gráfico 5 - Distribuição dos participantes do estudo conforme os sinais e sintomas relatados de forma autônoma no questionário.....	85
Gráfico 6 - Distribuição dos participantes do estudo conforme os diagnósticos relatados de forma autônoma no questionário.....	87
Gráfico 7 – Distribuição comparativa da abundância relativa dos filos que apresentaram diferença significativa em relação a idade e sexo na população analisada (n=85).....	90
Gráfico 8 - Distribuição comparativa da abundância relativa entre o sexo feminino e masculino, com diferença significativa demonstrando maior abundância no sexo masculino para o gênero <i>Faecalibacterium</i>	95
Gráfico 9 - Distribuição comparativa da abundância relativa dos gêneros que apresentaram redução da abundância com a elevação do IMC, e altamente prevalentes na amostra analisada.....	97
Gráfico 10 - Distribuição comparativa da abundância relativa dos gêneros <i>Prevotella</i> e <i>Collinsella</i> que apresentaram aumento da abundância com a elevação do IMC na amostra.....	98
Gráfico 11 - Distribuição comparativa da abundância relativa entre o sexo feminino e masculino, com diferença significativa, demonstrando maior abundância no sexo masculino na espécie <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	102
Gráfico 12 - Gráfico 12 - Distribuição da abundância relativa da espécie <i>Fusicatenibacter saccharivorans</i> nas diferentes idades mostrando redução com o avançar da idade.....	104
Gráfico 13 – Distribuição da raridade de acordo com o sexo nas diferentes faixas etárias.....	108
Gráfico 14 - Distribuição dos dados das diferenças entre as abundâncias das espécies do MI dos 85 indivíduos amostrados da população brasileira.....	109
Gráfico 15 - Distribuição dos dados das diferenças, por Bray-Curtis, entre as abundâncias das espécies do MI dos 85 indivíduos amostrados da população brasileira em dois clusters, os mais abundantes em <i>Prevotella copri</i> e os mais abundantes em <i>Bacteroides</i>	110

Gráfico 16. Distribuição dos dados das diferenças, por Bray-Curtis, entre as abundâncias das espécies do MI dos 85 indivíduos amostrados da população brasileira em três clusters.....	110
Gráfico 17. Distribuição dos dados das diferenças, por Bray-Curtis, entre as abundâncias das espécies do MI dos 85 indivíduos amostrados da população brasileira em quatro clusters.....	111
Gráfico 18. Distribuição dos valores do índice GMHI do MI dos participantes do estudo classificados como controles (n=6) e casos (n=79) obtidos por este estudo.....	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição dos pontos de corte do IMC e sua interpretação da classificação do estado nutricional de indivíduos adultos.....	84
Quadro 2 – Distribuição dos pontos de corte do IMC e sua interpretação da classificação do estado nutricional de indivíduos idosos.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição percentual da abundância relativa em nível de Filo do domínio Bacteria, encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros.....	88
Tabela 2 - Distribuição percentual da abundância relativa em nível de Classe do domínio Bacteria, encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros.....	91
Tabela 3 - Distribuição percentual da abundância relativa em nível de Ordem do domínio Bacteria, encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros.....	91
Tabela 4 - Distribuição percentual da abundância relativa em nível de Família do domínio Bacteria, encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros.....	92
Tabela 5 – Distribuição percentual da abundância relativa e prevalência encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros em nível de Gênero do domínio Bacteria.....	93
Tabela 6 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa apresentou-se aumentada de forma significativa no sexo feminino quando comparado com o masculino.....	94
Tabela 7 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa apresentou-se aumentada de forma significativa no sexo masculino quando comparada com o feminino.....	95
Tabela 8 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa reduziu de forma significativa com o avançar da idade.....	96
Tabela 9 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa elevou de forma significativa com o avançar da idade.....	96
Tabela 10 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa reduziu de forma significativa com o elevar do IMC.....	97
Tabela 11 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa aumentou de forma significativa com o elevar do IMC.....	98

Tabela 12 – Distribuição percentual da abundância relativa e prevalência encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros em nível de Espécies do domínio Bacteria até a abundância relativa de 0,1%.....	99
Tabela 13 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa apresentou-se aumentada de forma significativa no sexo feminino quando comparado com o masculino.....	101
Tabela 14 – Espécies bacterianas cujas abundâncias relativas apresentaram-se aumentadas de forma significativa no sexo masculino quando comparado com o feminino.....	102
Tabela 15 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa reduziu de forma significativa com o avançar da idade.....	103
Tabela 16 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa elevou de forma significativa com o avançar da idade.....	104
Tabela 17 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa reduziu de forma significativa com o elevar do IMC.....	105
Tabela 18 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa aumentou de forma significativa com o elevar do IMC.....	106
Tabela 19- Valores dos índices de diversidade alfa do MI distribuídas para o sexo feminino e masculino da amostra populacional analisada (n=85).....	106
Tabela 20 – Valores médios dos índices de diversidade alfa do MI distribuídas para o sexo feminino e masculino da amostra populacional analisada (n=85).....	107
Tabela 21 – Valores médios dos índices de diversidade alfa do MI para as diferentes classificações do IMC da amostra populacional analisada (n=85).....	107
Tabela 22 – Valores médios dos índices de diversidade alfa do MI para as diferentes faixas etárias da amostra populacional analisada (n=85).....	108
Tabela 23 - Valores do GMHI obtidas nas amostras do MI (n=85).....	112
Tabela 24 – Valores das medianas do GMHI do MI distribuídas para os controles e os casos da amostra populacional analisada (n=85).....	113

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVO.....	20
1.1.1	Objetivo geral.....	20
1.1.2	Objetivos específicos.....	20
2	DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1	MICROBIOMA HUMANO.....	21
2.2	MICROBIOMA INTESTINAL HUMANO.....	27
2.2.1	Fatores relacionados ao ambiente.....	29
2.2.2	Fatores relacionados ao hospedeiro.....	43
2.2.2.1	<i>Índice de Massa Corporal (IMC).....</i>	50
2.2.2.2	<i>Idade.....</i>	62
2.2.2.3	<i>Sexo.....</i>	68
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	71
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES.....	71
3.3	ESTRUTURA DO QUESTIONÁRIO.....	72
3.4	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	73
3.4.1	Coleta das amostras de fezes.....	74
3.4.2	Extração do DNA.....	74
3.4.3	Preparo das amostras de DNA para leitura.....	75
3.5	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	76
3.6	ÍNDICES DE DIVERSIDADE ALFA.....	76
3.7	DIVERSIDADE BETA.....	77
3.8	ÍNDICE DE SAÚDE DO MICROBIOMA INTESTINAL (GMHI).....	77
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
4	RESULTADOS.....	81
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	81
4.1.1	Distribuição por Estados.....	81
4.1.2	Distribuição por Sexo.....	82

4.1.3	Distribuição por Idade.....	83
4.1.4	Índice de Massa Corporal (IMC).....	83
4.1.5	Controles x Casos.....	85
4.2	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	87
4.2.1	Abundância relativa de táxons nos diferentes níveis de classificação.....	88
4.2.1.1	<i>Filo.....</i>	88
4.2.1.2	<i>Classe.....</i>	91
4.2.1.3	<i>Ordem.....</i>	91
4.2.1.4	<i>Família.....</i>	92
4.2.1.5	<i>Gênero.....</i>	93
4.2.1.5.1	Abundância dos Gêneros por sexo.....	94
4.2.1.5.2	Abundâncias dos Gêneros por Idade.....	96
4.2.1.5.3	Abundâncias dos Gêneros de acordo com o IMC.....	96
4.2.1.6	<i>Espécies.....</i>	98
4.2.1.6.1	Abundância de Espécies de acordo com o Sexo.....	101
4.2.1.6.2	Abundância de Espécies de acordo com a Idade.....	103
4.2.1.6.3	Abundância de Espécies de acordo com o IMC.....	105
4.3	ÍNDICES DE DIVERSIDADE.....	106
4.3.1	Diversidades Alfa.....	106
4.3.2	Beta diversidade.....	109
4.4	ÍNDICE PARA MICROBIOMA INTESTINAL SAUDÁVEL (GMHI).....	112
5	DISCUSSÃO.....	114
5.1	ABUNDÂNCIA DOS FILOS.....	114
5.2	ABUNDÂNCIA DAS FAMÍLIA.....	117
5.3	ABUNDÂNCIA DOS GÊNEROS.....	118
5.4	ABUNDÂNCIA DAS ESPÉCIES.....	122
5.4.1	Espécies mais abundantes e mais prevalentes de toda amostra.....	123
5.4.1.1	<i>Bacteroides uniformis.....</i>	123
5.4.1.2	<i>Bacteroides vulgatus.....</i>	125
5.4.1.3	<i>Parabacteroides distasonis.....</i>	127
5.4.1.4	<i>Bacteroides thetaiotaomicron.....</i>	129

5.4.1.5	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	131
5.4.2	Espécies mais abundantes em toda a amostra.....	134
5.4.2.1	<i>Prevotella copri</i>	134
5.4.2.2	<i>Alistipes putredinis</i>	137
5.4.2.3	<i>Bacteroides dorei</i>	138
5.4.2.4	<i>Bacteroides stercoris</i>	140
5.4.2.5	<i>Eubacterium sp CAG:180</i>	141
5.4.2.6	<i>Eubacterium rectale</i>	141
5.4.2.7	<i>Bacteroides fragilis</i>	144
5.4.2.8	<i>Akkermansia muciniphila</i>	145
5.4.3	Espécies mais prevalentes.....	148
5.4.3.1	<i>Fusicatenibacter saccharivorans</i>	148
5.4.3.2	<i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>	150
5.5	ALFA DIVERSIDADE.....	151
5.6	BETA DIVERSIDADE.....	151
5.7	ÍNDICE PARA MICROBIOMA INTESTINAL SAUDÁVEL (GMHI).....	151
6	CONCLUSÕES.....	153
	REFERÊNCIAS.....	155
	ANEXO A – Registro de aprovação na Plataforma Brasil.....	181
	ANEXO B – Orientação para coleta de fezes recebida pelos participantes.....	185
	APENDICE 1 – ÍNDICES DE DIVERSIDADE.....	186

1 INTRODUÇÃO

A ‘ERA’ das ciências ômicas acelerou todos os aspectos da pesquisa biológica, e seus efeitos foram muito relevantes para os estudos de comunidades microbianas e do microbioma humano. Desde a publicação do primeiro genoma humano, os estudos de microbioma cresceram a partir de pesquisas baseadas na cultura da cavidade oral e intestino para perfis moleculares de bioquímica microbiana em todos os nichos ecológicos do corpo humano (PROCTOR *et al.*, 2019) e de diversos ambientes marinhos (MALLA *et al.*, 2019), rurais e urbanos (DANKO *et al.*, 2021).

Os primeiros estudos do microbioma humano com a tecnologia de sequenciamento de 16S RNA ribossomal (rRNA) foram desenvolvidos por Ruth Ley, Peter Turnbaugh, Samuel Klein e Jeffrey Gordon para acompanhar a mudança no perfil dos microrganismos intestinais de indivíduos obesos em restrição alimentar pelo período de um ano. Nestes estudos já puderam identificar que as espécies microbianas permaneciam mais constantes dentro de um mesmo indivíduo, e que entre os indivíduos apresentava alta diversidade, mas com um domínio dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (LEY *et al.*, 2006).

O Projeto Microbioma Humano, lançado em 2007 pelo Instituto Nacional de Saúde Norte Americano (NIH), foi uma das primeiras iniciativas em grande escala. Em sua primeira fase procurou determinar se havia elementos comuns aos microbiomas ‘saudáveis’, na ausência de doença evidente. Envolveu estudos de população adulta sem doenças e populações de "demonstração" com estados de doença específicos. Foi possível identificar perfis ecológicos de nichos corporais como vagina, pele, intestino, entre outros. A etnia e pH vaginal possuem associações particularmente fortes, já a idade e o IMC representaram associações fenotípicas modestas (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

Logo em seguida, no ano de 2008, a Comissão Européia deu início ao MetaHit (Metagenomics of the Human Intestinal Tract), projeto que reuniu 15 Institutos de 8 países membros para desenvolver estudos do microbioma humano. Associações entre o microbioma intestinal humano e duas doenças crescentes na Europa foram estudadas: a Doença Inflamatória Intestinal e a Obesidade (QIN *et al.*, 2010).

O HMP Integrativo (iHMP ou HMP2), que foi projetado para explorar a interação hospedeiro-microbioma, incluindo imunidade, metabolismo e atividade molecular dinâmica, para obter uma visão mais holística das interações hospedeiro-microrganismo ao longo do tempo.

Alcançaram o primeiro estágio de conclusão em 2019, forneceram uma riqueza de informações e percepções sobre a dinâmica microbiana, assim como as respostas do hospedeiro humano associadas e as inter-relações microbianas (PROCTOR *et al.*, 2019). Esforços continuam sendo realizados para identificar marcadores de saúde ou de condições de doença no microbioma intestinal humano, a partir de espécies microbianas, como o Índice de Saúde do Microbioma Intestinal (GUPTA *et al.*, 2020).

Alguns pesquisadores, como Chatterjee e Thakur (2012) e Moossavi (2014) observaram que as pesquisas de microbioma intestinal dos grandes Consórcios eram realizadas apenas em indivíduos ocidentais, e que estes estudos deveriam ser ampliados com a inclusão de fatores como geografia, hábitos alimentares, ambiente, idade, tradições e mudanças no estilo de vida.

Impulsionados por este movimento estudos foram desenvolvidos com populações mais diversas International Human Microbiome Consortium (Internacional), MetaGenoPolis e MicroObes (França), The Australian Jumpstart Human Microbiome Project (Austrália), Canadian Human Microbiome Initiative (Canadá), Human Gut Microbiome and Infections (China), DAFF/HRB elderly gut metagenomics Project ELDERMET (Irlanda), Human Metagenome Consortium (Japão), além de estudos com gêmeos: Korean Microbiome Diversity Using Korean Twin Cohort Project (Coreia) (MOOSSAVI, 2014; XIE *et al.*, 2016), dentre outros.

Os dados gerados foram processados por diversos pesquisadores criando catálogos de genes de referência para uso em estudos de microbioma intestinal humano (QIN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2014; NIELSEN *et al.*, 2014; DHAKAN *et al.*, 2019; FORSTER *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2020).

Alguns estudos foram desenvolvidos na América Latina e no Brasil (ALENCAR, 2017; CONTEVILLE; OLIVEIRA-FERREIRA; VICENTE, 2019) com povos tradicionais, mas ainda estão longe dos esforços realizados pelos demais países. Um fato importante a ser considerado é que a população brasileira se encontra em transição para o urbano (MOURA; OLIVIERA; FILHO, 2018) e que o microbioma da população urbana ainda não foi caracterizado.

1.1 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos desta dissertação.

1.1.1 Objetivo geral

Verificar e caracterizar a riqueza e abundância do microbioma intestinal humano em uma amostra da população brasileira urbana e industrializada, e estabelecer relações entre o microbioma e parâmetros individuais e ambientais. A partir dos dados gerados por sequenciamento genético realizado através da tecnologia de Whole Genome Sequencing Shotgun (WGS-shotgun) e dos dados individuais coletados em questionários estruturados, que foram disponibilizados para o trabalho.

1.1.2 Objetivos específicos

- Quantificar as diversidades alfa, beta e abundância da microbiota intestinal humana amostrada a partir da análise do microbioma através de técnicas de metagenoma;
- Analisar a relação entre a diversidade do microbioma intestinal humano amostrado e os fatores extrínsecos relacionados ao ambiente e hospedeiro, como sexo, idade e IMC;
- Caracterizar o microbioma da população brasileira, tendo como início a construção de um banco de microbiomas desta população;
- Comparar os dados obtidos com a literatura científica atual discutindo os resultados obtidos.

2 DESENVOLVIMENTO

Nas seções que seguem será realizada revisão da literatura científica a respeito do microbioma humano de forma geral, mas também direcionado ao microbioma intestinal humano com alguns dos fatores relacionados à sua complexa ligação com o hospedeiro.

2.1 MICROBIOMA HUMANO

Em um artigo interessante onde discute a origem e define o termo microbioma, Susan L. Prescott (2017), cita a definição elaborada em 1988 por Whipps, Lewis e Cooke que está diretamente alinhada com seu uso atual em microbiologia:

“Uma estrutura ecológica conveniente para examinar os sistemas de biocontrole é a do microbioma. Isso pode ser definido como uma comunidade microbiana característica que ocupa um habitat razoavelmente bem definido que possui propriedades físico-químicas distintas. O termo, portanto, não se refere apenas aos microrganismos envolvidos, mas também abrange seu teatro de atividade.”

Apesar de bem definido na literatura desde a sua primeira utilização, o termo microbioma é constantemente utilizado para falar de microbiota. Enquanto a microbiota se restringe a coleção de microrganismos em um local ou amostra específica, o microbioma é usado para se referir à sua capacidade de codificação gênica coletiva (CLAESSON *et al.*, 2017). Portanto, o microbioma humano engloba o complemento total de genes microbianos, produtos gênicos e genomas da microbiota (incluindo os microrganismos bactérias, archaea, vírus bacteriófagos e microrganismos eucariotos) que habitam o corpo humano (PROCTOR, 2011; HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

O termo metagenoma é utilizado para se referir ao conjunto de dados determinados experimentalmente a partir do sequenciamento dos genomas de microrganismos em uma amostra particular (CLAESSON *et al.*, 2017). O campo da metagenômica envolve a caracterização dos genomas dessas comunidades, bem como seus correspondentes produtos de RNA mensageiro, proteínas e produtos metabólicos (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

Inicialmente os estudos de microbioma humano estimavam que os microrganismos superavam em número as células somáticas e germinativas humanas em um fator de dez (WHITMAN *et al.*, 1998; LEY *et al.*, 2006; TURNBAUNG *et al.*, 2007). Mas este conceito foi revisto e atualmente é possível dizer que as células microbianas que colonizam o corpo humano (ambientes mucosos e cutâneos), são quase tão abundantes quanto as células somáticas e certamente contêm muito mais genes do que o genoma humano. Com base na observação experimental e extrapolação chega-se a uma proporção de 1,3 células bacterianas para cada 1 célula humana (SENDER *et al.*, 2016). Embora estes cálculos reduzam a extensão em que as células microbianas superam as células humanas, elas não reduzem as estimativas associadas à diversidade da vida microbiana associada ao corpo humano (REYES *et al.*, 2010; GILBERT, 2018). O microbioma relacionado com a genética do hospedeiro, resulta no que foi denominado de “super-organismo” (TURNBAUGH *et al.*, 2006).

Em uma estimativa conservadora sugere-se que os animais possuem microrganismos residentes realizando funções metabólicas há no mínimo 500 milhões de anos. Extensas filogenias congruentes de hospedeiros animais e sua microbiota, envolvendo tanto organismos individuais quanto populações microbianas inteiras sugerem a existência de seleção específica baseada na co-adaptação (CHO; BLASER, 2012). Coevolução, co-adaptação e co-dependência são características de relacionamento do hospedeiro com a microbiota (BLASER; FALKOW, 2009).

Interações cooperativas entre microrganismos e seus hospedeiros tipicamente envolvem a participação microbiana em funções do hospedeiro, como defesa, metabolismo e reprodução (BLASER; FALKOW, 2009). No entanto, estudos de animais denominados gnotobióticos, que são animais que possuem flora microbiológica conhecida não detectável ou não existente (COUTO, 2002), mostraram que estes microrganismos não são necessários para vida ou para a conclusão de um ciclo de vida animal. Embora a comparação entre camundongos que possuem a microbiota normal e os gnotobióticos indicou que a microbiota é responsável pela maioria dos metabólitos detectados no plasma. Paradoxalmente, portanto, parece não haver um requisito absoluto para uma microbiota residente funcional, mas também não ocorre gnotobiose na natureza (BLASER; FALKOW, 2009).

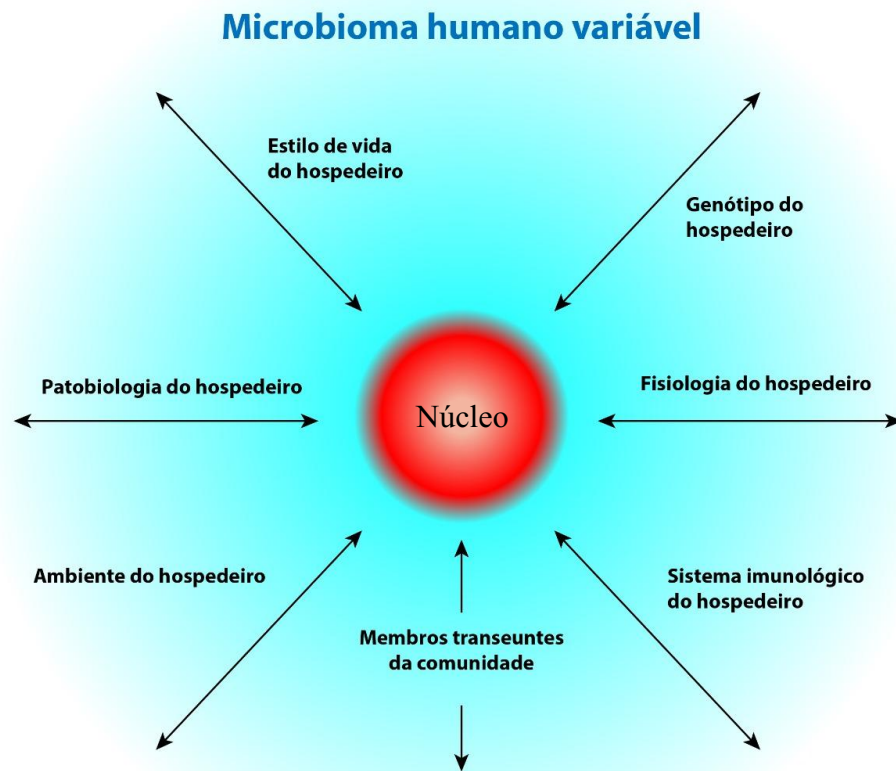
Alguns dos microrganismos comensais podem ser benéficos por algum tempo, mas causarem a morte em outra fase da vida, como é o caso dos *Streptococcus* alfa-hemolíticos não patogênicos (BLASER; FALKOW, 2009) ou da *H. pylori* (CHO; BLASER, 2012). Esta relação de

microrganismos que podem ser simbioses ou parasitas é chamada de “anfibiose” (BLASER; FALKOW, 2009).

Em todos estes anos de pesquisas desde os grandes esforços internacionais para estudar o microbioma algumas relações já ficaram bem definidas: a) cada ser humano parece carregar seu próprio conjunto, amplamente individual, de cepas microbianas, que b) são adquiridas no início da vida, c) diferem entre ambientes e populações e d) podem persistir por anos ou e) passar por transições relativamente rápidas. A diversidade microbiana se manifesta de maneira diferente em diferentes nichos ecológicos do corpo; por exemplo, geralmente se espera maior diversidade no intestino, mas pode estar associada a estados disbióticos e risco de eventos adversos no trato reprodutivo feminino. O microbioma pode ser perturbado por condições como doença inflamatória intestinal e diabetes, mas uma variedade de estados de saúde ligados ao microbioma e os fundamentos dessas ligações permanecem inexplorados (PROCTOR *et al.*, 2019).

Um dos conceitos interessantes sugeridos para a variabilidade do microbioma humano está apresentada na Figura 1 e traz a ideia de que existam pelo menos duas grandes variáveis para o microbioma: um “núcleo” de certa forma constante entre os indivíduos e as influências variáveis.

Figura 1 - O núcleo do microbioma humano e suas possíveis influências variáveis. O centro do esquema, representado pela graduação da cor vermelha, sugere que exista um núcleo do microbioma humano que pode ser mais constante entre os indivíduos humanos. A graduação de cor azul sugere as influências variáveis do microbioma humano, representando o conjunto de genes presentes em um determinado habitat em um subconjunto menor de seres humanos



Fontes: Adaptado de Turnbaugh *et al.* (2007).

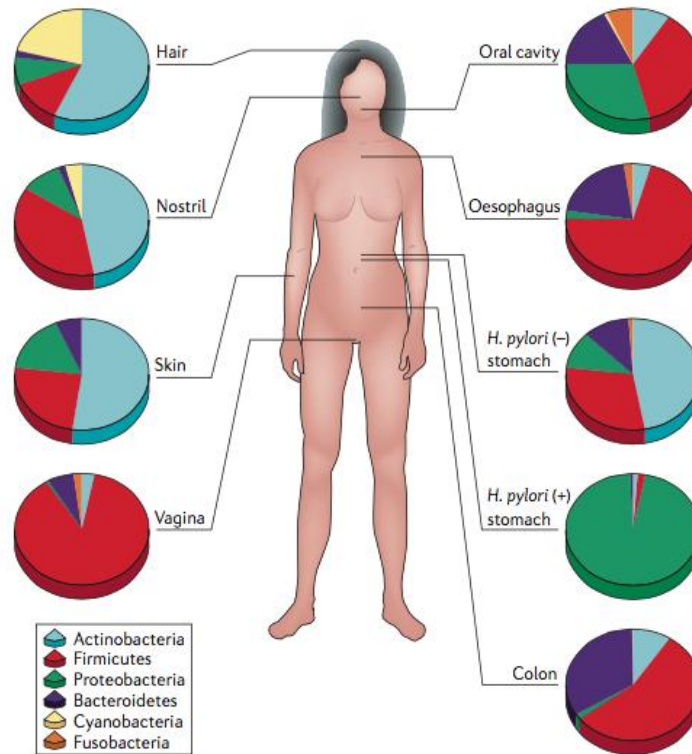
O núcleo (do inglês “*core*”) do microbioma humano é apresentado como sendo o conjunto de genes da microbiota presentes em um dado habitat ou na grande maioria dos seres humanos. Habitat pode ser definido em várias escalas, desde o corpo inteiro até uma área de superfície específica, como o intestino ou uma região dentro do intestino. Essa variação pode resultar de uma combinação de fatores do hospedeiro como genótipo, estado fisiológico (incluindo as propriedades dos sistemas imune inato e adaptativo), patobiologia (estado da doença), estilo de vida (incluindo dieta), ambiente (em casa e ou trabalho) e a presença de populações transitórias de microrganismos que não podem colonizar persistentemente um habitat. A gradação na cor do núcleo indica a possibilidade de que, durante a microevolução humana, os genes da microbiota podem ser incluídos no microbioma central, enquanto outros genes podem ser excluídos (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

No trabalho realizado por Danko *et al.* (2021), um estudo multicêntrico que caracterizou o microbioma urbano através da análise de 4.728 amostras do sistema de trânsito de massas, em 60 cidades ao redor do mundo, utilizando tecnologia NGS, observaram uma distribuição bimodal de táxons nos dados analisados. A partir desta observação, definiram como pontos de corte para estabelecer dois conjuntos separados de táxons: o conjunto putativo “sub-núcleo” de espécies microbianas urbanas constantemente observadas (> 70% das amostras), e as espécies menos comuns, ou “periféricas” (<25% das amostras). Ainda definiram um conjunto de táxons “essenciais” que ocorrem em mais de 97% das amostras. Aliando, portanto, à definição de núcleo não apenas à questão dos genes presentes no microbioma, como o sugerido por Turnbaugh *et al.* (2007), mas também às espécies. Neste sentido, utilizamos em nossas análises o conceito de núcleo relacionado às espécies identificadas.

Portanto, vemos a partir destes autores que se seguiram, que o núcleo do microbioma pode ser analisado, tanto em observações de genes, quanto de taxa.

É notável a diversidade dos microrganismos que ocupam os diferentes habitats corporais como o intestino, a pele e a vagina (Figura 2). Grande parte dessa diferença permanece inexplicada, embora a dieta, o ambiente, a genética do hospedeiro e a exposição microbiana precoce tenham sido implicados (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

Figura 2 - Diferenças na composição do microbioma nos diferentes locais anatômicos. Proporção relativa de sequências determinadas ao nível do filo taxonômico em oito locais anatômicos humanos. Certas características, como a presença (+) ou ausência (-) de *Helicobacter pylori*, podem levar a perturbações permanentes e marcantes na composição da comunidade do estômago



Fonte: Cho e Blaser (2012).

Diversos estudos que realizaram sequenciamento de alto rendimento revelaram substancial variação do microbioma intra-individual em diferentes sítios anatômicos e variação interindividual nos mesmos locais anatômicos. No entanto, características taxonômicas de nível superior (por exemplo, no nível de filós) apresentam estabilidade temporal (longitudinal) em indivíduos e em locais anatômicos específicos. Tais diferenças específicas do local anatômico e a observada conservação entre os hospedeiros humanos proporcionam um quadro importante para determinar o significado biológico e patológico de uma composição particular do microbioma (CHO; BLASER, 2012).

O Projeto Microbioma Humano encontrou uma estimativa de 81-99% dos gêneros bacterianos, famílias de enzimas e configurações da comunidade ocupadas pelo microbioma ocidental saudável. Quando comparados os indivíduos viu-se que as vias metabólicas foram estáveis entre os indivíduos, apesar da variação na estrutura da comunidade (taxa), e a origem étnica provou ser uma das mais fortes associações (tanto para as vias, como para microrganismos) (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Observou-se que a função metabólica variou menos do que a

composição taxonômica (HUTTENHOWER *et al.*, 2012; LLOYD-PRICE *et al.*, 2017) em amostras de um determinado local do corpo.

2.2 MICROBIOMA INTESTINAL HUMANO (MIH)

A maioria dos 10 a 100 trilhões de microrganismos no trato gastrointestinal humano (TGI) vive no cólon. Nas observações de populações urbanas e industriais, mais de 90% de todos os tipos filogenéticos de bactérias colônicas pertencem apenas a 4 das 70 divisões filotípicas conhecidas no domínio Bactérias: as Firmicutes e os Bacteroidetes, sendo seguidos pelos filos Proteobacteria e Actinobacteria (SAVAGE, 1977; TURNBAUGH *et al.*, 2007; QIN *et al.*, 2010; HUTTENHOWER *et al.*, 2012). O filo dos Firmicutes inclui bactérias gram-positivas com parede celular rígida ou semi-rígida (STOJANOV; BERLEC; STRUKELJ, 2020).

Através dos diferentes estudos, Turnbaugh *et al.* (2007) afirmaram que há, em torno de, 1.000 espécies bacterianas no TGI. Como cada bactéria possui em média 2.000 genes por espécie, pode-se estimar um total de 2.000.000 genes bacterianos, o que representa mais de 100 vezes o número comumente estimado de, aproximadamente, 20.000 genes humanos. Esta afirmação é concordante com o tamanho real dos catálogos de genes microbianos encontrados por MetaHIT e o Human Microbiome Project, dentre outros (QIN *et al.*, 2010; HUTTENHOWER *et al.*, 2012; GILBERT, 2018; PROCTOR *et al.*, 2019). Portanto, o microbioma contém muito mais genes do que o genoma do hospedeiro humano e sua composição muda com o tempo dentro de um mesmo indivíduo (GILBERT *et al.*, 2016; PROCTOR *et al.*, 2019).

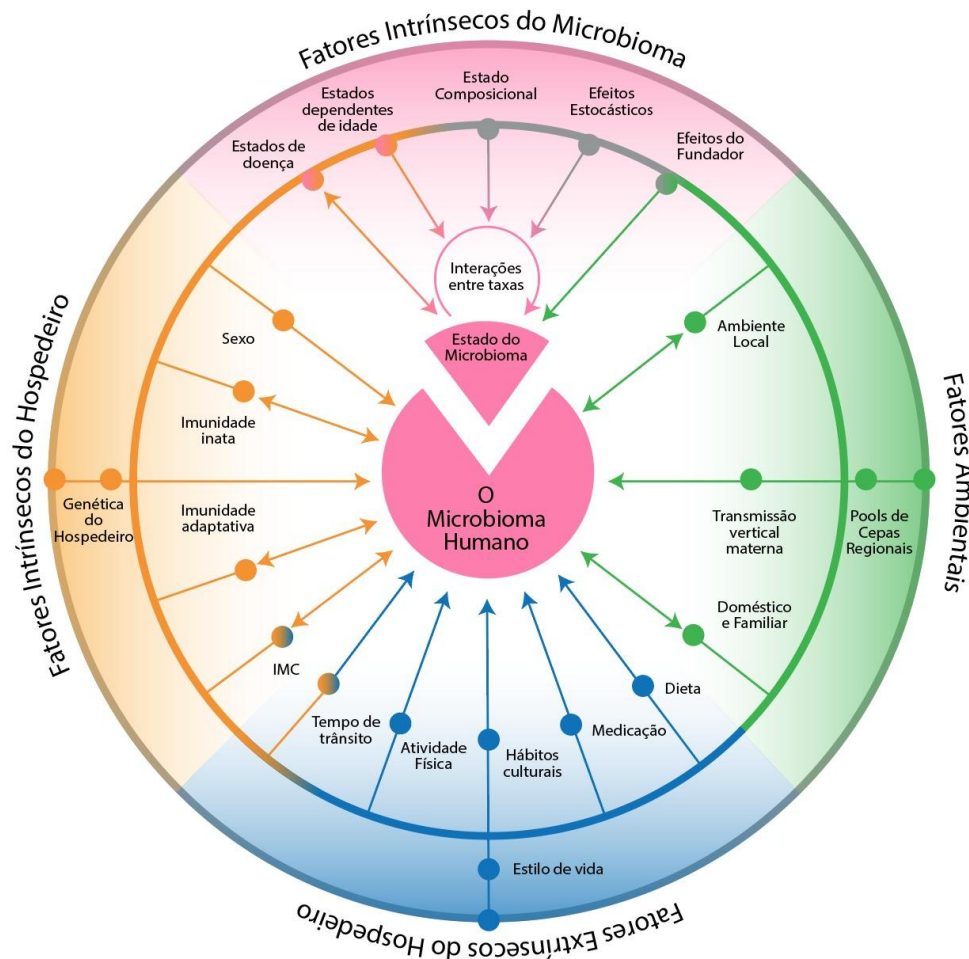
Desde 1965, quando Dubos *et al.* estudaram as bactérias intestinais de ratos albinos, foi hipotetizado que a “microflora intestinal” de qualquer espécie de animal é composta de três categorias de microrganismos: os presentes durante a evolução do animal de forma mais individual (microbiota autóctone indígena), aqueles que se estabelecem de forma geral em todos os indivíduos na comunidade do animal (microbiota normal) e os patógenos verdadeiros que foram adquiridos acidentalmente, mas que são capazes de persistir no sistema (DUBOS *et al.*, 1965; SAVAGE, 1977).

Estes conceitos foram validados e aprimorados pela ciência. Cada pessoa pode ser vista como uma “ilha” de habitat ocupada por associações microbianas formadas pelos processos fundamentais da ecologia da comunidade: dispersão, diversificação local, seleção ambiental e

deriva ecológica. A teoria da montagem da comunidade, e a teoria da metacomunidade, fornecem uma estrutura para a compreensão da dinâmica ecológica do microbioma humano, como a variabilidade da composição dentro e entre os hospedeiros. Pode-se pensar em três cenários principais de montagem do microbioma humano: a) a montagem em habitats anteriormente desocupados, representado pelo desenvolvimento em bebês; b) montagem após perturbação, representado pela recuperação de antibióticos; e c) montagem no contexto de espécies invasoras, representado pela invasão por patógenos (COSTELLO *et al.*, 2012).

Uma proposta interessante, sobre os fatores que moldam as inter-relações entre a microbiota, o hospedeiro e o ambiente, foi apresentada por Schmidt, Raes e Bork (2018) e demonstrada na Figura 3. A composição taxonômica do microbioma intestinal varia muito entre os indivíduos, devido a fatores intrínsecos e extrínsecos do microbioma. Os fatores intrínsecos (1) do microbioma dependem do estado do microbioma, após a maturação no indivíduo, ele se retroalimenta através da interação entre os táxons. Já os fatores extrínsecos (2) do microbioma referem-se aos diversos fatores ambientais que interagem com o microbioma intestinal, relacionados tanto com o ambiente de forma geral (influências regionais de cepas ou transmissão vertical), como fatores extrínsecos ao hospedeiro (estilo de vida) e fatores intrínsecos do hospedeiro (genética do hospedeiro).

Figura 3 - Representação da composição do microbioma intestinal humano.



Fonte: Adaptada de Schmidt, Raes e Bork (2018).

Na prática, é desafiador separar o tamanho do efeito de fatores individuais, e muitas vezes é necessário estratificar para outras covariáveis, em particular também para o estado do microbioma. O efeito geral das covariáveis conhecidas para o microbioma intestinal humano é surpreendentemente pequeno, pois mesmo os fatores mais fortes explicam apenas uma fração surpreendentemente pequena da variação do microbioma intestinal interindividual, em um tamanho de efeito combinado estimado na faixa de 10% a 15% (FALONY *et al.*, 2016; SHMIDT; RAES; BORK, 2018).

A seguir abordaremos de forma mais ampla os fatores que estão ligados mais diretamente aos objetivos deste estudo.

2.2.1 Fatores relacionados ao ambiente

Embora, grande parte da história da humanidade tenha sido gasta forrageando nas florestas, o advento da agricultura há aproximadamente 10.000 anos e a industrialização há aproximadamente 250 anos marcam grandes mudanças no estilo de vida humano (JHA *et al.*, 2018).

O ambiente urbano de alta densidade, historicamente, abrigou apenas uma fração de todas as pessoas, com a maioria vivendo em áreas rurais ou pequenas aldeias. Nas últimas duas décadas, a situação se inverteu; 55% da população mundial agora vive em áreas urbanas (DANKO *et al.*, 2021).

A partir do século XIX, e acelerando, no século XX houve mudanças importantes na ecologia humana, como acesso a água mais limpa, famílias menores, aumento no número de cesarianas, no uso de antibióticos pré-termo, redução da amamentação e uso generalizado de antibióticos, principalmente em crianças pequenas (BLASER; FALKOW, 2009). Mas o processo de industrialização não atingiu todo o mundo da mesma forma, coexistindo os estilos de vida e as formas de subsistência.

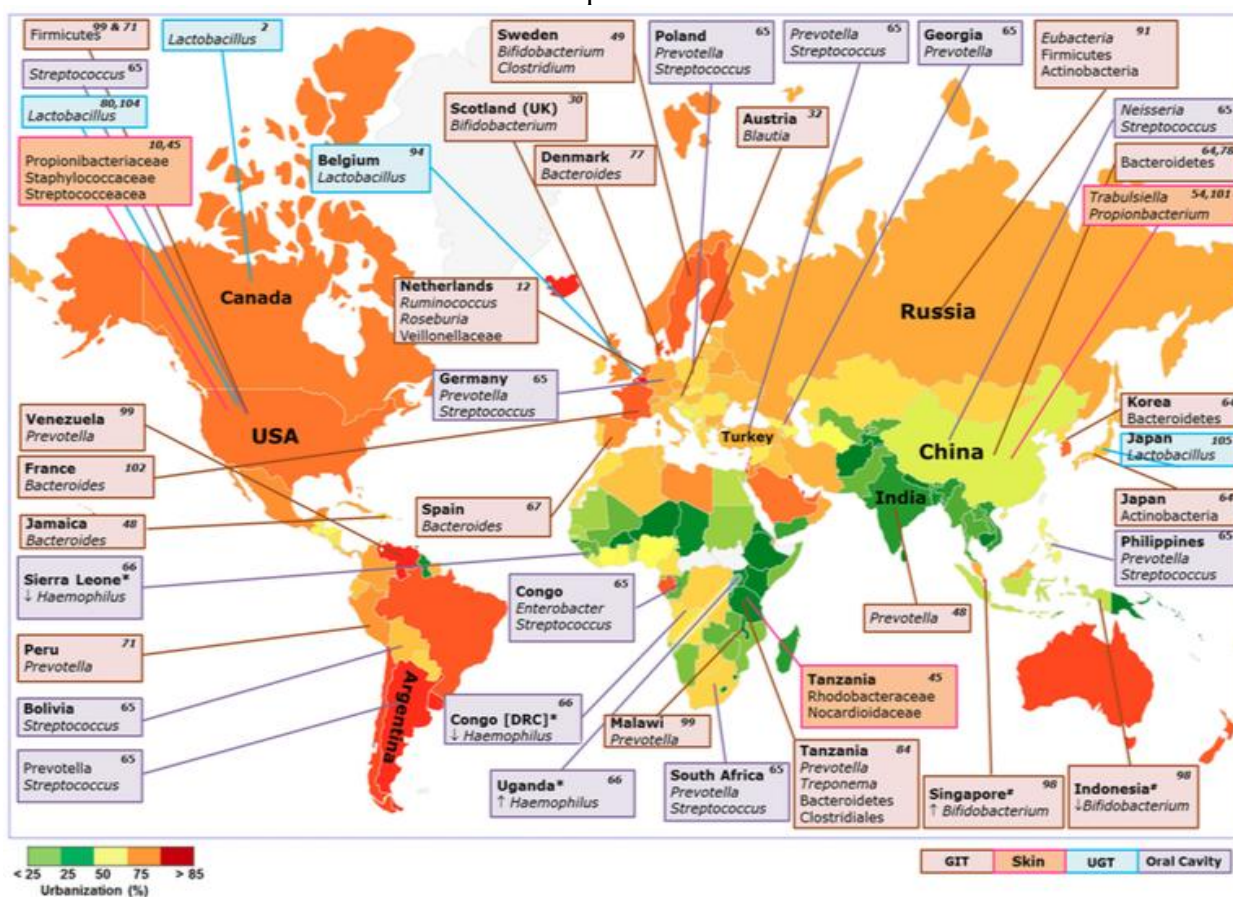
Neste sentido, a localização geográfica é um dos fatores relacionados ao ambiente que se mostra importante nas análises do microbioma, uma vez que dieta, saneamento e acesso a cuidados médicos estão frequentemente associados a características geográficas e culturais que diferenciam as populações em comparação e confundem as variáveis do estilo de vida (JHA *et al.*, 2018). Além disso, a geografia torna-se importante a partir da compreensão de que representa também um conjunto de fatores genéticos, além dos ambientais e culturais, já citados, dos indivíduos que habitam determinado local (GUPTA *et al.*, 2017).

Entretanto, o grau em que o microbioma é moldado por cada um desses fatores permanece em discussão, não está claro qual fator desempenha um papel dominante na formação do microbioma (natureza ou nutrição, genética do hospedeiro ou seu ambiente, tradições ou estilo de vida). Jha *et al.* (2018) referem que tem sido difícil separar as contribuições dos fatores genéticos e geográficos humanos do estilo de vida. Se as mudanças no estilo de vida de caça e coleta, que caracterizam grande parte do passado da humanidade, influenciam o microbioma intestinal, e em que grau, ainda não está claro.

Os estudos iniciais, e a grande maioria dos trabalhos sobre o microbioma humano, que já foram citados anteriormente nesta dissertação, foram realizados pelos Estados Unidos, Europa e outros países chamados ocidentalizados (países ocidentais, educados, industrializados, ricos e

democráticos) que geralmente representam a população urbana (Figura 4). Por este motivo, os resultados obtidos nestas populações foram utilizados como referência para os estudos que se seguiram.

Figura 4 - Taxa enriquecido em vários nichos do corpo humano em diversas populações ao redor do mundo. Cor da caixa: habitat corporal (GIT – trato gastrointestinal, Skin – pele, UGT – trato uro-genital, Oral cavity – cavidade oral); Cor no mapa: porcentagem de urbanização de países (<http://www.unicef.org/>), sendo que cores verdes indicam baixo percentual e cores avermelhadas alto percentual de urbanização. Seta para cima: abundância dominante de filo/gênero em comparação com a respectiva população. Seta para baixo: Baixas abundâncias de Filo/Gênero/família em comparação com a respectiva população; * e # comparações entre países específicos



Fonte: Gupta *et al.* (2017).

Entretanto, cada vez mais iniciativas têm sido tomadas para a caracterização do microbioma humano em diversas populações étnicas, com o crescimento da coleta de dados e descrição das estruturas do microbioma em diversas populações não-americanas ou não-ocidentais. Esses estudos mostraram variações significativas na composição do microbioma em indivíduos

saudáveis de diferentes etnias. Ficou evidente que o nível de ocidentalização de cada população estudada e modo de vida característicos impactam na diversidade e taxonomia do microbioma intestinal. Há diferenças entre povos caracterizados como caçadores-coletores e a população ocidentalizada na composição do microbioma intestinal que foram atribuídas principalmente à questão alimentar e ao ambiente, mas também ao uso de medicamentos (GUPTA *et al.*, 2017; JHA *et al.*, 2018; VANGAY *et al.*, 2019; FRAGIADAKIS *et al.*, 2019; SONNENBURG; SONNENBURG, 2019), como pode-se observar na Figura 5.

Figura 5 - Transição gradual na composição do microbioma intestinal a partir de mudanças na estratégia de subsistência do hospedeiro. A. Partindo de uma população remota caracterizada principalmente pela coleta de alimentos, caça, contato com a natureza em sua forma selvagem. B. População de fazendeiros tradicionais ou pescadores tradicionais que utilizam também a agricultura de subsistência. C. População urbana industrializada ocidental.

Transição gradual da composição de MIH de acordo com o modo de subsistência



Fonte: Figura adaptada de Gupta *et al.* (2017).

O microbioma intestinal das populações de caçadores-coletores possui maior prevalência de algumas famílias de bactérias, como *Prevotella*, *Succinivibrionaceae*, *Paraprevotellaceae*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Clostridiales*, *Ruminobacter*, entre outros e possuem reduzidas abundâncias de *Bacteroidales* e *Lachnospiraceae*. Enquanto, o microbioma das comunidades urbanas é frequentemente enriquecido em *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Verrucomicrobia* e *Firmicutes* (GUPTA *et al.*, 2017; FRAGIADAKIS *et al.*, 2019).

Nos estudos realizados, por Fragiadakis *et al.* (2019), com uma população de caçadores-coletores da Tanzânia, onde compararam a abundância relativa de *Prevotellaceae* dos Hadza com outras populações de caçadores-coletores da Venezuela e Malawi, e com uma população urbana dos EUA, foi possível verificar que esta família de bactérias se mantém elevada nas populações tradicionais. Embora diferenças entre as microbiotas de populações industrializadas e tradicionais possam ser esperadas, a conservação de níveis mais elevados de *Prevotellaceae* e outros taxons em populações tradicionais geograficamente separadas sugere que esses organismos evoluíram como particularmente bem adaptados ao seu hospedeiro humano. A associação desses microrganismos com um estilo de vida que definiu os humanos durante grande parte de sua existência como espécie sugere que as funções associadas a esses taxons podem ter moldado a biologia humana e parece ter se perdido com a industrialização.

Uma observação interessante, foi que, na população de Hadzas houve variação da família de *Prevotellaceae* durante os períodos de chuva e seca, reduzindo significativamente sua presença durante a estação molhada, portanto se mostrando voláteis em sua abundância na mudança sazonal. Incluem nesta sazonalidade a coleta de frutas silvestres e o consumo de mel que são mais frequentes durante a estação chuvosa, enquanto a caça tem mais sucesso durante a seca. O consumo de tubérculos ricos em fibras e baobá ocorre o ano todo (SMITS *et al.*, 2017). Essa descoberta indica que a volatilidade em abundância pode servir como um marcador de microrganismos que são vulneráveis à erradicação por meio de várias perturbações, incluindo aquelas associadas à modernização. A partir desta observação foi sugerida uma referência aos táxons que se perderam ou se tornaram raros dentro do ecossistema intestinal industrializado como táxons VANISH (Voláteis e/ou Associados Negativamente às Sociedades Industrializadas de Humanos) que se referem especificamente às famílias *Prevotellaceae*, *Succinivibrionaceae*, *Paraprevotellaceae* e *Spirochaetaceae* (SMITS *et al.*, 2017; FRAGIADAKIS *et al.*, 2019).

Na Tanzânia, uma investigação entre os Hadza realizada por Fragiadakis *et al.* (2019) verificaram as possíveis influências do ambiente da caça e coleta na presença das famílias de bactérias voláteis, definidas anteriormente como VANISH. E encontraram correspondência destas famílias nas fontes alimentares animais. Os Hadza consomem uma dieta composta principalmente de tubérculos, baobá, frutas vermelhas, mel e carne de caça. Estas análises foram realizadas na época das secas, com coletas intestinais e das mãos dos caçadores-coletores e também das amostras de mel, fezes, pelo e esfregaços estomacais dos animais caçados. Os animais coletados foram dik-dik (*Madoqua* sp.), kudu menor (*Tragelaphus imberbis*), impala (*Aepyceros* sp.), hyrax (*Heterohyrax brucei*), zebra (*Equus* sp.), vaca (*Bos taurus*) e macaco-vervet (*Chlorocebus pygerythrus*). As bactérias VANISH foram identificadas com mais frequência nas fezes dos animais, podendo representar um reservatório ambiental para as bactérias das famílias Prevotellaceae, Paraprevotellaceae, Succinivibrionaceae e Spirochaetaceae.

Na análise ambiental, a água também é uma importante questão a ser considerada, já que uma das principais características de uma sociedade industrializada é a água sanitizada, e são utilizados diversos compostos químicos para eliminar fontes de microrganismos. A água disponível na época da seca na Tanzânia na região dos Hadza também foi analisada. Coletadas de poço, riacho e leito de rio seco as amostras variavam de composição, mas possuíam altos níveis de Prevotellaceae, em torno de 10% de Spirochaetaceae e baixos níveis de Paraprevotellaceae (FRAGIADAKIS *et al.*, 2019). Durante a maior parte da existência humana foram consumidos alimentos e água carregados de microrganismos, muitos causadores de doenças, mas que faziam parte da exposição ambiental humana. A mudança recente para o consumo de alimentos e água amplamente esterilizados provavelmente também influenciou a microbiota (SONNENBURG; SONNENBURG, 2019).

Foi realizado um estudo controlado na população de caçadores-coletores da Tanzânia, no acampamento Ukamako, onde os indivíduos consumiam principalmente baobá, raízes, frutos silvestres e mel. O estudo se baseou na mudança alimentar tradicional com a oferta de milho debulhado não moído no dia zero (“Dia 0”). Nos dias seguintes, o milho foi consumido no café da manhã, almoço e jantar. Foram analisadas amostras fecais nos dias anteriores (4 e 2 dias antes) e posteriores (2 e 4 dias depois) à chegada do milho para doze indivíduos; oito desses indivíduos foram amostrados em todos os cinco dias sequenciais (-4, -2, 0, 2, 4) antes e durante o consumo do milho. A análise das distâncias Unifrac não ponderadas revelou uma mudança no primeiro

componente principal nas 24 horas e 48 horas após o consumo do milho, em relação aos dias antes do consumo do milho na maioria dos indivíduos. Estes dados sugerem que uma mudança na dieta produz mudanças rápidas na microbiota no Hadza (FRAGIADAKIS *et al.*, 2019).

Estudo recente e inovador, realizado por Wibowo *et al.* (2021) para reconstruir genomas microbianos humanos a partir de fezes de indivíduos paleolíticos (paleofezes) comparou 8 amostras de paleofezes com amostras de populações atuais não industriais (22 do México, 174 de Fiji, 36 do Peru, 112 de Madagascar e 27 da Tanzânia), com amostras de populações atuais industriais (147 dos EUA do HMP, 22 dos EUA, 109 da Dinamarca e 140 da Espanha). A composição taxonômica das paleofezes é mais semelhante com as amostras não industriais do que com as industriais. Nenhum dos filos é significativamente diferente entre as paleofezes e as amostras não industriais. Em contraste, Bacteroidetes e Verrucomicrobia são enriquecidos nas amostras industriais em comparação com as paleofezes e as amostras não industriais. Firmicutes, Proteobacteria e Spirochaetes são significativamente menos abundantes nas amostras industriais em relação às paleofezes e nas amostras não industriais. No nível familiar, os membros dos táxons VANISH são significativamente enriquecidos nas amostras de paleofezes em relação às amostras industriais. Em contraste, os membros das famílias da taxa de BloSSUM, que foram definidos como taxas de “florescimento ou selecionados em sociedades de urbanização e modernização” são mais abundantes nas amostras industriais em comparação com as amostras não industriais e as amostras de paleofezes (Bacteroidaceae e Verrucomicrobiaceae). Em comparação com as amostras não industriais, apenas Spirochaetaceae é enriquecido nas paleofezes.

A análise de componentes principais em nível de espécie mostra que as amostras de paleofezes se agrupam com as amostras não industriais e são distintas das amostras industriais. As espécies enriquecidas nas amostras industriais em relação às paleofezes e às não industriais incluem *Akkermansia muciniphila* e membros dos gêneros *Alistipes* e *Bacteroides*. Por outro lado, *Ruminococcus champanellensis* e membros do gênero *Enterococcus* são enriquecidos nas paleofezes em comparação com as amostras não industriais e industriais. A espécie *Treponema succinifaciens* é enriquecida tanto nas paleofezes quanto nas amostras não industriais em relação às amostras industriais. *Treponema succinifaciens* e, de forma geral, o filo *Spirochaetes* foram propostos como perdidos em populações industriais. Esses resultados suportam que o microbioma intestinal humano industrial divergiu de seu estado ancestral. Foi construída uma árvore filogenética para os genomas bacterianos do intestino filtrado de alto dano e 4.930 genomas de

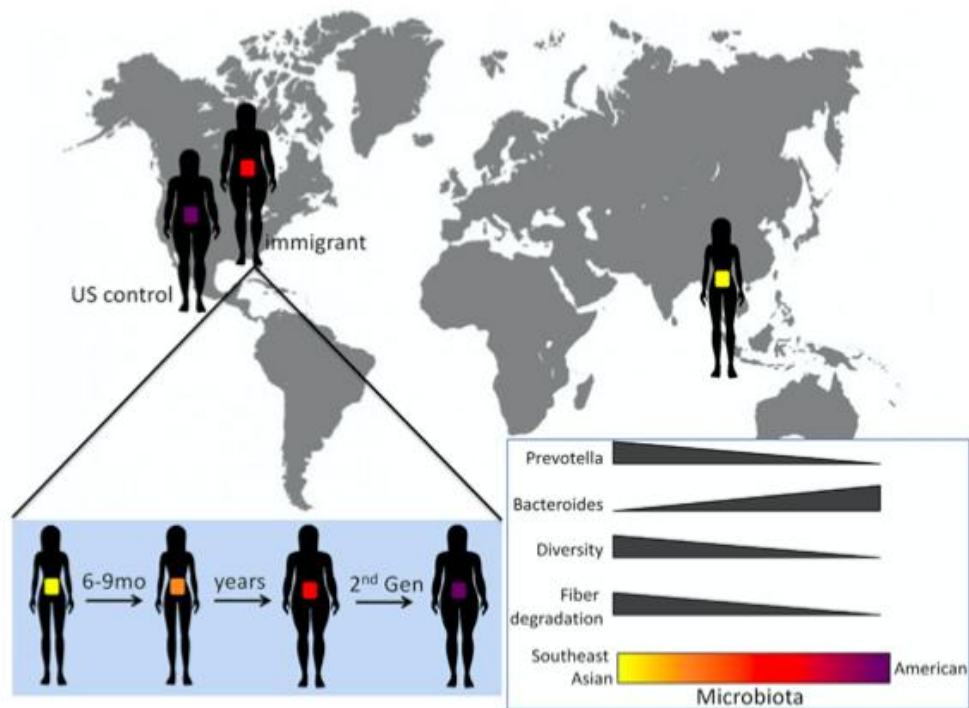
referência que são representativos do microbioma humano. Os resultados indicam que os genomas antigos abrangem muitos filos associados ao microbioma intestinal humano, incluindo Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Árvores filogenéticas para *Prevotella* e *Ruminococcus* mostram que os genomas antigos não descritos anteriormente não se agrupam intimamente com os genomas de referência (WIBOWO *et al.*, 2021).

Uma marca da dieta industrializada no microbioma intestinal é o muco do hospedeiro, que serve como fonte alimentar de reserva para os microrganismos intestinais quando a fibra dietética é limitada. A seleção de bactérias que utilizam muco em populações industrializadas é evidente no enriquecimento de *Akkermansia muciniphila* (filo Verrucomicrobia), que foi encontrada em uma comparação mundial de microbiomas industrializados e não industrializados (SONNENBURG; SONNENBURG, 2019).

Quando há comparação entre populações remotas e populações urbanas verifica-se redução de gêneros de bactérias nas populações urbanas, como constatado por Gupta *et al.* (2017) em sua revisão de literatura, que pode verificar redução de 17 para 14 gêneros do microbioma intestinal entre as populações de caçadores-coletores de Papua Nova Guiné, Peru e Tanzânia com a população urbana do Reino Unido e EUA.

Os estudos de migração são muito interessantes para registrar esta transição no microbioma intestinal. A imigração tem sido fundamental para a humanidade, uma vez que a espécie humana se espalhou pelo mundo. A imigração moderna pode resultar na assimilação cultural, incluindo a adoção de novas dietas, estilo de vida e práticas médicas, como pode ser visto na figura 7 (SONNENBURG; SONNENBURG, 2018). Estudo realizado por Vangay *et al.* (2018) para verificar as mudanças ocorridas em decorrência da imigração de regiões mais remotas e com características primitivas para regiões ocidentais realizaram estudo relacionando a imigração humana da Tailândia para os Estados Unidos da América (EUA) com a mudança no perfil do microbioma intestinal. Recrutaram indivíduos saudáveis do sexo feminino nativos residentes da Tailândia, nativos da Tailândia imigrantes para os EUA e descendentes de imigrantes nascidos nos EUA que foram comparados com nativos norte americanos saudáveis com ascendência européia também do sexo feminino, cujos pais e avós nasceram nos EUA.

Figura 6 - Efeitos da imigração para os EUA na microbiota intestinal de indivíduos do sudeste da Ásia.



Fonte: Sonnenburg e Sonnenburg (2018).

Entre os registros alimentares dos nativos tailandeses e as gerações nascidas nos EUA houve um aumento na variedade dos alimentos consumidos. Na composição do microbioma intestinal através de sequenciamento do gene 16S rRNA, foi identificado que há diferenças entre os microbiomas intestinais das populações nativas para os norte-americanos. A maior diferença no microbioma intestinal ocorreu na primeira geração de imigrantes nascidos nos EUA com os nativos tailandeses. A diversidade e riqueza microbiana foram maiores nos nativos tailandeses e reduziram a cada geração nos EUA. Nos grupos dos indivíduos obesos também foi verificada uma menor diversidade filogenética, independente do grupo ao qual pertenciam. Houve redução de algumas espécies de bactérias na primeira geração, como é o caso de *Faecalibacterium prausnitzii* e de algumas no gênero *Prevotella*. O gênero *Bacteroides* associado aos indivíduos ocidentais, substituiu a redução do gênero *Prevotella* ao longo das gerações dos imigrantes nos EUA. Esta mudança foi observada em todos os imigrantes, e também nos que haviam recém-chegado aos EUA e que formaram uma coorte longitudinal de estudo. A quantidade de cepas diferentes pertencentes a cada gênero também foi mais variada quanto mais abundante o gênero (VANGAY *et al.*, 2018).

Quanto ao perfil funcional do microbioma, nos nativos tailandeses havia enriquecimento de vias de degradação de carboidratos mais complexos, já nos imigrantes

enriquecimento para a degradação de glicose/xilose/glicerol/sacarose, potencialmente relacionados ao aumento de consumo de alimentos açucarados. A perda desses glicosídeos hidrolases pode estar associada à perda de fontes de fibra alimentar que promovem a persistência dos organismos que abrigam essas enzimas, reduzindo a capacidade da microbiota de degradar essas fibras alimentares. E estava relacionada à redução nas espécies de *Prevotella copri* que possuíam as hidrolases relacionadas. Entretanto, a dieta explicou apenas 16,8% da variação total na análise de componentes principais (VANGAY *et al.*, 2018). Esses resultados provavelmente refletem o impacto de outros fatores associados ao estilo de vida industrializado sobre a microbiota e podem revelar que dietas diferentes podem ocidentalizar da mesma forma a microbiota (SONNENBURG; SONNENBURG, 2018).

Portanto a migração populacional de indivíduos de regiões com características não-ocidentalizadas para regiões com características ocidentalizadas pode modificar o perfil do microbioma intestinal dos imigrantes para um perfil mais ocidentalizado desde curtos períodos de tempo após a chegada e amplia esta modificação para os níveis mais profundos da estrutura do microbioma com o passar do tempo e das gerações. Estas mudanças alteram não somente o perfil taxonômico, mas também o perfil funcional do microbioma com a redução do perfil relacionado ao processamento de fibras, por exemplo (VANGAY *et al.*, 2018; SONNENBURG; SONNENBURG, 2018). Os autores relacionam estas mudanças observadas com o modelo proposto por Blaser e Falkow (2009) de desaparecimento de microbiota humana pelas grandes mudanças trazidas pelo progresso social e da medicina.

Outro estudo interessante que verificou este modelo de transição do microbioma intestinal foi o realizado por Jha *et al.* (2018) onde caracterizaram a composição bacteriana das fezes de quatro populações do Himalaia, no Nepal, comparados com uma população de americanos com ascendência européia. Esses grupos levaram estilos de vida de caça-coleta semi-nômades até a transição para vários níveis de dependência agrícola (da agricultura). Os Tharu começaram a cultivar alimentos há 250-300 anos, os Raute e Raji que possuem estilo de vida misto (começaram a cultivar alimentos entre 30 e 40 anos, mas ainda coletam) e os Chepang mantêm muitos aspectos de um estilo de vida de caçadores-coletores, mas já são produtores de cultivos de subsistência. Os resultados do estudo indicaram que os indivíduos Chepang possuem um microbioma intestinal relacionado à elevadas abundâncias de táxons de populações de caçadores-coletores, os Tharu se assemelham mais ao microbioma da população industrializada, devido à mudança para o estilo de

vida com dependência agrícola. Os Raute e Raji que fizeram a transição há menos tempo possuem um padrão de microbiota intermediário entre os agricultores e os tradicionais. Este estudo é interessante devido à semelhança genética compartilhada entre as populações estudadas e o compartilhamento da mesma região geográfica. A comparação dessas populações tradicionais do Himalaia com americanos industrializados mostrou que todas as quatro populações do Himalaia exibiram distâncias muito maiores dos americanos do que quando comparadas umas às outras. Os Chepang eram os mais distantes dos americanos, seguidos pelos Raute, enquanto os Raji e Tharu eram igualmente próximos dos americanos.

As populações do Himalaia foram caracterizadas por maior abundância de Proteobacteria, enquanto as abundâncias de Actinobacteria, Firmicutes e Verrucomicrobia foram maiores nos americanos ocidentais, intermediárias nos fazendeiros (Tharu, Raji e Raute) e menores nas forrageadoras Chepang. Níveis mais altos de Proteobacteria e níveis mais baixos de Actinobacteria e Verrucomicrobia são características comuns de muitos microbiomas intestinais humanos tradicionais em todo o mundo. Chepang foram enriquecidas com *Ruminobacter*, *Campylobacter* e *Treponema* em relação aos agricultores Tharu (JHA *et al.*, 2018).

No filo dos Bacteroidetes as comunidades rurais do Himalaia foram enriquecidas em *Prevotella*, *Alloprevotella* e *Anaerophaga* e significativamente esgotadas em *Bacteroides*, *Alistipes*, *Butyricimonas*, *Odoribacter* e *Barnesiella*. Os americanos mostraram maiores abundâncias de *Bifidobacterium* (Actinobacteria) e *Akkermansia* (Verrucomicrobia), ambas extremamente baixas nas forrageadoras Chepang e intermediárias nos fazendeiros Tharu. Abundâncias elevadas de *Treponema* e *Prevotella* com redução de *Bacteroides* e *Bifidobacterium* é uma característica dos microbiomas intestinais de comunidades forrageiras (JHA *et al.*, 2018).

Com as populações do Himalaia os autores queriam determinar se as redes microbianas também estavam associadas aos diferentes estilos de vida. Foram calculadas as correlações entre todos os pares de gêneros intestinais usando SparCC, que revelou sete grupos de coabundância bacteriana (CAG). Os gêneros dominantes que definiram estes CAGs foram *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Escheria/Shigella*, *Suturella*, *Prevotella* e *Dialister*. O CAG dominado por *Prevotella* foi mais proeminente nas populações mais tradicionais (Chepang e Raute), enquanto os membros do CAG dominados por *Bacteroides* são elevados no Raji e Tharu. Por outro lado, o intestino americano é altamente empobrecido do *Prevotella* CAG e é dominado pelo CAG *Bacteroides* (JHA *et al.*, 2018).

Na população brasileira alguns estudos foram realizados para caracterizar as diferenças entre uma população com características mais tradicionais e em transição para um ambiente mais industrializado.

Os Yanomami são o maior grupo indígena semi-isolado da Amazônia a manter práticas tradicionais de subsistência baseadas na caça, pesca, coleta e roça. As principais diferenças entre o microbioma intestinal desses grupos são que os indivíduos caçadores-coletores/agricultores rurais abrigam um microbioma intestinal mais diverso, com níveis mais elevados de bactérias degradadoras de fibras e táxons que estão esgotados nas populações urbanas industrializadas. Possuem dieta pobre em gordura e sal e rica em frutas, fibras e animais silvestres (CONTEVILLE; OLIVEIRA-FERREIRA; VICENTE, 2019).

A alimentação deste povo é caracterizada pelo consumo de sementes, raízes e seus derivados, frutos da floresta (mel, raízes, frutos de palmeiras), caça (cobras, porcos selvagens, macacos, veados, onças, insetos, larvas) e pesca (peixe, caranguejos). A água potável é captada diretamente de poços e riachos desprotegidos. Consomem bebidas alcoólicas elaboradas por eles mesmos e, desde a infância, possuem o hábito de manter na boca tabaco enrolado em cinzas. Mas já há a introdução de alimentos industrializados, como arroz e feijão, e o uso de alguns medicamentos da medicina moderna que podem influenciar na composição do microbioma intestinal desta população (ALENCAR, 2017; CONTEVILLE; OLIVEIRA-FERREIRA; VICENTE, 2019).

Alencar (2017) realizou estudo de caracterização taxonômica do microbioma bacteriano intestinal de indígenas Yanomami na Amazônia brasileira, e de indivíduos não-Yanomami moradores da cidade de Manaus no Amazonas, nos estados de Roraima e Amazonas. Utilizando sequenciamento para a região 16S do rRNA. Verificou-se em nível de filo maior abundância relativa de Bacteroidetes e Firmicutes nos indígenas Yanomami em todas as idades. Nos indivíduos não-Yanomami urbanos houve maior abundância destes mesmos filos em bebês, crianças e adultos, mas em idosos esta distribuição se inverteu. Na análise dos gêneros presentes no microbioma houve identificação de 71 gêneros, sendo 6 destes exclusivos para Yanomami (*Pluralibacter*, *Exiguobacterium*, *Rhodococcus*, *Peptostreptococcus*, *Succinivibrio* e *Treponema*) e 5 para indivíduos urbanos de Manaus (*Turicibacter*, *Mitsuokella*, *Pseudoflavonifractor*, *Parasutterella* e *Megamonas*). Houve maior abundância relativa do gênero *Prevotella*, *Lactobacillus* e *Blautia* na população indígena Yanomami quando comparada com indivíduos não-

Yanomami urbanos, cuja maior abundância foi do gênero *Bacteroides* em todas as idades. Por outro lado, a população de Manaus ainda apresentou uma maior abundância do gênero *Prevotella*. Verificou-se maior diversidade alfa para a população indígena analisada em todas as faixas etárias. Esta relação indica que, apesar do contato com os indivíduos urbanos e talvez de terem perdido alguns tipos de bactérias, a população indígena Yanomami ainda apresenta um microbioma intestinal característico dos povos coletores.

Em estudo realizado por Conteville, Oliveira-Ferreira e Vicente (2019), o microbioma intestinal dos povos indígenas Yanomami que vivem na Floresta Amazônica brasileira foi comparado com os que vivem na Venezuela, com os povos Matses da Amazônia Peruana, com os Tunapuco do planalto andino e com um grupo urbano-industrializado dos Estados Unidos (HMP). Já entre os povos tradicionais Yanomami brasileiros e venezuelanos houve diferenças na funcionalidade do microbioma. Os pesquisadores sugeriram que, apesar de compartilhar o estilo de vida e a herança genética, as diferenças poderiam ser reflexo da diversidade ambiental e sazonal dos nichos explorados por cada população entre os Yanomami brasileiros e venezuelanos. Foi possível identificar que o valor da diversidade alfa para os povos tradicionais relacionados acima é maior do que a da população urbana industrializada. Em relação à diversidade beta, os indivíduos Yanomami e os demais povos tradicionais possuem maior variação interpessoal quando comparados aos da população urbana. Mas de forma geral o perfil do microbioma é compartilhado com os povos tradicionais sul-americanos e africanos já estudados na literatura científica e descritos neste trabalho.

Quando analisado o perfil taxonômico dos grupos tradicionais e urbano, observou-se uma diferença nítida em nível de filo, sendo que os tradicionais Yanomamis, Matses e Tunapuco obtiveram maior abundância relativa de Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Spirochaetes, sendo que o grupo urbano se caracterizou principalmente por Bacteroidetes. Nos Yanomamis brasileiros e venezuelanos o Filo Proteobacteria foi o mais prevalente. A distribuição de gêneros nos grupos tradicionais se deu de formas distintas, não havendo homogeneidade entre os povos. Os gêneros *Treponema* e *Brachyspira* (Filo Spirochaetes) foram identificados em Yanomamis brasileiros e venezuelanos, assim como nos demais grupos tradicionais, mas não no grupo urbano. Os padrões taxonômicos gerais observados no microbioma intestinal dos grupos tradicionais da América do Sul se assemelham aos perfis do microbioma intestinal de grupos tradicionais da África Ocidental, Central e Oriental, embora cada um deles tenha características únicas. Apesar de

pertencerem a grupos étnicos distintos, vivem e exploram ecossistemas diferentes, mantêm um modo de subsistência tradicional e não têm acesso a alimentos processados e refinados diariamente. Por este motivo as autoras afirmam que o estilo de vida populacional é um dos principais determinantes da composição e diversidade do microbioma intestinal, sobrepondo-se aos antecedentes genéticos e à origem geográfica (CONTEVILLE; OLIVEIRA-FERREIRA; VICENTE, 2019).

A microbiota abrigada por humanos habitantes no mundo industrializado tem uma configuração não experimentada antes da revolução industrial. Esta “nova” microbiota foi moldada por recentes avanços na medicina, alimentação e saneamento. No meio urbano, a tecnologia e a medicina limitaram a exposição a microrganismos patogênicos e possibilitaram alimentar grandes populações de forma barata. Os avanços com o objetivo de melhorar a qualidade de vida e a longevidade foram implementados na ausência da compreensão dos danos colaterais infligidos aos microrganismos simbiotes residentes no corpo humano ou da importância destes para a saúde. Perturbações de dieta, antibióticos e práticas médicas propagadas por gerações e sinérgicas com higiene e saneamento intensificados para resultar nas reconfigurações do ecossistema em toda a população observadas hoje (SONNENBURG; SONNENBURG, 2019).

A microbiota intestinal emergiu como um modulador crítico e indicador da saúde humana e de doenças (SCHMIDT; RAES; BORK, 2018). A nova relação simbiótica ou anfibiótica estabelecida pela sociedade moderna pode conectar a microbiota aos desfechos de doenças crônicas causadas pela inflamação. Notavelmente as doenças crônicas modernas se propagam junto com os fatores de estilo de vida que são conhecidos por alterar a microbiota. Embora os pesquisadores tenham descoberto os princípios básicos de como a microbiota influencia a saúde humana, tem havido uma percepção crescente de que, à medida que o estilo de vida industrial se espalha globalmente, as mudanças na microbiota humana podem ser centrais para a disseminação do fator não-transmissível relacionado às doenças crônicas e que não podem ser facilmente revertidas (SONNENBURG; SONNENBURG, 2019).

Embora muitas ligações associativas e causais tenham sido estabelecidas entre a microbiota e os resultados de saúde, os táxons microbianos, a funcionalidade e os estados metabólicos que são protetores ou impulsionam o desenvolvimento de doenças são mal compreendidos (FRAGIADAKIS *et al.*, 2019). Não está claro se as mudanças do microbioma

causam a doença ou vice-versa, ou se o estado da doença e os efeitos do microbioma observados são causados por um terceiro fator (SCHMIDT; RAES; BORK, 2018).

Ainda é preciso aprender a distinguir melhor entre simbioses, patógenos e anfíbios e avaliar se e quais microrganismos ou vias metabólicas eliminar, deixar de lado ou restaurar. É necessário refletir se é sensato contemplar qualquer ação até que seja possível entender mais sobre os mesmos. Uma maior compreensão das características do genoma e da microbiota de um hospedeiro, e suas interações, levará a abordagens individualizadas para a prevenção e tratamento de doenças específicas. É uma fronteira científica. Olhar para as populações, em todo o mundo, que foram minimamente afetadas pela industrialização, pode servir como um modelo para identificar organismos críticos e funcionalidade que foram perdidos nas populações industrializadas (BLASER; FALKOW, 2009; FRAGIADAKIS *et al.*, 2019).

Entretanto, ainda não se sabe se a microbiota encontrada em populações tradicionais, que compartilha mais semelhanças com a dos antepassados, melhoraria a saúde dos indivíduos que vivem em uma sociedade industrializada. Se a perda ou redução de taxa de VANISH causa ou contribui para a carga crescente de doenças crônicas não-transmissíveis em humanos ainda não foi determinada. Determinar a importância potencial da taxa VANISH para a biologia humana exigirá esforços para manter sua diversidade antes que ela seja perdida. Agir para minimizar a perda não intencional de biodiversidade é provavelmente uma estratégia sábia até que saibamos mais (SONNENBURG; SONNENBURG, 2019; WIBOWO *et al.*, 2021).

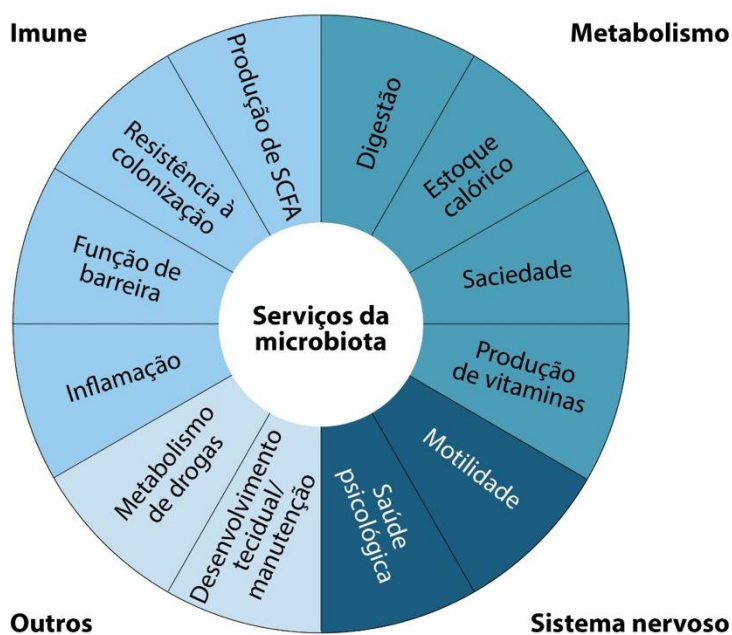
Sugere-se que uma dieta rica em alimentos integrais e pobre em alimentos processados, juntamente com o aumento da exposição a microrganismos não patogênicos, possa ser benéfica para as populações industriais. Mas arriscar o aumento de doenças infecciosas ao reduzir os padrões de saneamento seria mal orientado, por isso é necessária uma melhor compreensão de como as práticas higiênicas moldam nossa microbiota, e o impacto resultante na saúde humana. Restaurar o consumo de microrganismos não causadores de doenças pode amenizar doenças que são comuns entre as populações que consomem alimentos e água esterilizados (SONNENBURG; SONNENBURG, 2019). A aplicação criteriosa da teoria ecológica pode levar a melhores estratégias para restaurar e manter a microbiota e os serviços ecossistêmicos associados à saúde que ela fornece (COSTELLO *et al.*, 2012).

2.2.2 Fatores relacionados ao hospedeiro

A variação genética entre as populações humanas é vista como diferenças nas frequências de alelos de genes do *Homo sapiens* compartilhados. Mas outra fonte de diversidade genética e metabólica reside nas diferenças da representação dos milhões de genes e uma miríade de funções gênicas dentro das comunidades microbianas intestinais (YATSUNENKO *et al.*, 2012). Tims *et al.* (2011) afirma que todas as interações no microbioma dependem do genótipo do hospedeiro, que pode ser visto como uma matriz na qual o fenótipo do hospedeiro e a microbiota residente são projetados.

Em geral, parece que a microbiota humana e seus hospedeiros desenvolveram o equilíbrio juntos, de forma ordenada, à medida que a dieta, a geografia e ocasionais distúrbios ecológicos tiveram seus efeitos nos distintos, e diversos, antecedentes genéticos humanos. A complexa microbiota comensal protetora facilita a aquisição de nutrientes e vitaminas, promove o desenvolvimento e a integridade dos tecidos e estimula múltiplos aspectos da imunidade (BLASER; FALKOW, 2009). Algumas destas funções já bem estabelecidas estão representadas na Figura 3 que foi sugerida por Sonnenburg e Sonnenburg (2019).

Figura 7 - Serviços sistêmicos desempenhados pela microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de Sonnenburg e Sonnenbur (2019).

É fundamental dizer que existe uma camada de muco intestinal localizada na interface entre o epitélio intestinal e a microbiota; o muco é, portanto, um fator chave na comunicação entre o epitélio intestinal e a microbiota e atua na manutenção da homeostase intestinal. A ruptura desta camada protetora pode levar à inflamação (WRZOSEK *et al.*, 2013).

O muco é um gel viscoso, composto principalmente por glicoproteínas de alta massa molecular, denominadas mucinas. As mucinas são compostas por um núcleo de peptídeo rico em resíduos de serina e treonina que é decorado por oligossacarídeos unidos por ligações O- ou N-glicosídicas. Os oligossacarídeos são compostos por um ou mais de quatro açúcares primários (N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, galactose e fucose) e são terminados por ácidos siálicos ou grupos sulfato. Essa camada de muco é considerada um nicho ecológico para a microbiota intestinal. Pode servir como uma barreira para proteger o epitélio subjacente da fixação de patógenos e como uma fonte de nutrientes para bactérias comensais. A degradação da mucina é considerada um fator de patogenicidade, uma vez que a perda da camada protetora do muco pode expor as células do TGI a patógenos (DERRIEN *et al.*, 2004).

Este muco é secretado continuamente no lúmen do trato gastrointestinal por células epiteliais especializadas: as células caliciformes. O número e a função das células caliciformes são modulados pela microbiota intestinal. A microbiota expressa uma ampla gama de enzimas, que degradam carboidratos que processam compostos dietéticos indigestíveis e polissacarídeos de muco. O genoma do hospedeiro não codifica homólogos de muitas dessas enzimas, evidência da complementaridade entre hospedeiro e microbiota, e ilustrando a adaptação da microbiota intestinal ao ambiente digestivo do hospedeiro (WRZOSEK *et al.*, 2013).

Quando se observa o corpo humano como um ecossistema, a saúde humana pode ser interpretada como um produto dos serviços ecossistêmicos prestados, parcialmente, pela microbiota. Serviços estes relacionados, em grande parte, à produção de metabólitos essenciais, produzidos pela microbiota a partir de fontes alimentares de fibra não digerida. Dentre eles encontram-se extração de energia/nutrientes dos alimentos, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC: ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico), vitamina B12, ácido fólico, vitamina K, ácidos biliares, neurotransmissores (serotonina, dopamina, acetilcolina). Ainda pode desempenhar a função de modulação do fenótipo metabólico, fornecer fatores de crescimento acessórios, promover a diferenciação terminal pós-natal da estrutura e regulação do desenvolvimento epitelial, estimular os sistemas imunológico inato e adaptativo, e fornecer 'resistência à colonização' contra

a invasão de patógenos (SAVAGE, 1977; BLASER; FALKOW, 2009; COSTELLO *et al.*, 2012; VIEIRA-SILVA *et al.*, 2016; PRECUP; VODNAR, 2019). Dentro do microbioma, acredita-se que a repartição funcional seja impulsionada tanto pela competição microbiana e especialização de nicho quanto pela pressão seletiva do hospedeiro em direção ao comensalismo e redundância funcional (VIEIRA-SILVA *et al.*, 2016).

Ambientes ricos em nutrientes, como o intestino, geralmente favorecem bactérias de crescimento rápido, que são consumidoras de recursos rápidos, mas não tão eficientes. No entanto, o habitat intestinal possui uma característica peculiar, que é a remoção contínua de nutrientes ao longo do trato digestivo por meio da digestão, absorção e da fermentação. No intestino grosso, a depleção progressiva de substratos prontamente fermentáveis (principalmente sacarídeos) mostrou afetar a ecologia bacteriana, causando uma mudança da fermentação sacarolítica para a proteolítica do cólon proximal para o distal. Esta redução se mostrou associada à queda gradual na atividade bacteriana de renovação, que pode estar relacionada à reduzida capacidade dos especialistas proteolíticos em realizar crescimento quando comparados aos generalistas. Esses resultados indicam que tanto a depleção progressiva de carboidratos, prontamente fermentáveis ao longo do trato intestinal, quanto a diminuição relacionada na pressão ecológica para crescimento rápido criam um nicho para bactérias proteolíticas. Como os produtos finais da fermentação proteolítica têm efeitos potencialmente prejudiciais à saúde humana, a moderação da proteólise por meio do aumento do consumo de fibras fermentáveis não digeríveis tem sido alvo de pesquisas prebióticas. Estes estudos fornecem uma base ecológica para tais estratégias de modulação da microbiota intestinal (VIEIRA-SILVA *et al.*, 2016).

Vieira-Silva *et al.* (2016) instituíram a idéia de Módulos Metabólicos Intestinais (MMI) baseados nas três principais fontes de macronutrientes - os polissacarídeos, proteínas e lipídeos - metabolizados no intestino e sua associação com a estrutura genômica, os fatores de transcrição e os transportadores codificados pelo microbioma intestinal humano. Muito poucos MMIs eram onipresentes nas espécies de referência do intestino. Menos de 12% dos MMIs estavam presentes em mais de 70% das espécies do intestino, com um determinado módulo estando presente em 30% dos genomas em média. Assim, embora se acredite que os habitats associados ao hospedeiro exibam maior convergência metabólica do que os habitats de vida livre, esses resultados indicaram uma diversificação genômica significativa das capacidades metabólicas das espécies intestinais. As observações indicaram que as redes metabólicas intestinais se diferenciam principalmente por

meio da diversificação de unidades periféricas, sugerindo que a especialização de captação de substrato é o método favorecido para diversificação funcional em espécies intestinais intimamente relacionadas. Sendo assim, os autores chamam a atenção de que as espécies pertencentes ao mesmo gênero podem apresentar diferenças metabólicas importantes, não sendo garantida a consistência metabólica em nível de gênero.

O Filo dos Firmicutes representou as espécies mais generalistas quando relacionado ao metabolismo destes nutrientes, incluindo bactérias com capacidade lipolítica (4%), que são mais raras, como algumas do gênero *Eubacterium*. Entretanto quanto à degradação de sacarídeos, relacionou-se de forma mais forte aos substratos mais prontamente fermentáveis, como mono e dissacarídeos. Os Bacteroidetes associaram-se fortemente à degradação de polissacrídeos (pectina e amido) e também de mucina. As Actinobactérias apresentaram uma predominância sacarolítica. As Proteobactérias demonstraram capacidade lipolítica (beta-oxidação anaeróbica de ácidos-graxos e desvio de glioxilato) em 6% dos seus integrantes e capacidade de degradação de aminoácidos (VIEIRA-SILVA *et al.*, 2016).

Uma proposta interessante é a definição de enterótipos realizada por Arumugam *et al.* (2011), onde os enterótipos são principalmente conduzidos pela composição de espécies, entretanto as funções moleculares abundantes não são necessariamente fornecidas por espécies abundantes, destacando a importância de uma análise funcional para entender as comunidades microbianas.

Nesta proposta (ARUMUGAN *et al.*, 2011) cada um dos três enterótipos é identificável pela predominante variação nos níveis de um dos três gêneros: *Bacteroides* (enterótipo 1), *Prevotella* (enterótipo 2) e *Ruminococcus* (enterótipo 3). O enterótipo 3 pode ser impulsionado por outros grupos, como Clostridiales, Blautia e espécies da família Lachnospiraceae não identificados. Esses clusters têm características não aleatórias que podem ser modeladas e posteriormente usadas para classificar novas amostras. A robustez e previsibilidade dos enterótipos, em diferentes coortes e em vários níveis filogenéticos e funcionais, indicam que eles são o resultado de composições de comunidades microbianas bem equilibradas e definidas, das quais apenas um número limitado existe entre os indivíduos. Esses enterótipos não são tão nitidamente delimitados como, por exemplo, grupos sanguíneos humanos; são, em contraste, áreas densamente povoadas em um espaço multidimensional de composição comunitária. No entanto, eles são susceptíveis de caracterizar os indivíduos, de acordo com relatórios anteriores, de que a microbiota intestinal é bastante estável em indivíduos e pode até ser restaurada após perturbação. Em trabalho semelhante

a este faz os mesmos agrupamentos nos dois primeiros grupos, mas no terceiro grupo é impulsionado pela ordem Clostridiales, Blautia e Lachnospiraceae (QIN *et al.*, 2010).

O Enterótipo 1 foi achado significativamente enriquecido por *Bacteroides*, que co-ocorreu com *Parabacteroides*, *Acidamicoccus*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Anaerostipes* e Clostridiales. Os condutores desse enterótipo parecem derivar energia principalmente de carboidratos e proteínas, por meio da fermentação, visto que esses gêneros intimamente relacionados têm um potencial sacarolítico muito amplo, e porque genes que codificam enzimas envolvidas na degradação desses substratos (galactosidases, hexosaminidases, proteases), juntamente com as vias da glicólise e da pentose fosfato, são enriquecidas neste enterótipo. A produção de biotina, riboflavina e ascorbato foi significativamente enriquecida neste enterótipo, apesar de todas as vias estarem funcionantes em todos os enterótipos (ARUMUGAM *et al.*, 2011).

No estudo de Vieira-Silva *et al.* (2016), 40% dos Bacteroidetes, principalmente relacionados com *Bacteroides* e *Parabacteroides*, foram identificados como metabolizadores generalistas de nutrientes (sacarídeos, proteínas e lipídeos), enquanto 25% dos Bacteroidetes foram encontrados proteolíticos, relacionados principalmente à *Alistipes putredinis*. O enterótipo *Bacteroides* se apresentou mais sacarolítico e proteolítico do que os outros enterótipos (*Prevotella* e *Ruminococcus*), mas não mostrou diferenças na capacidade lipolítica quando comparado ao enterótipo 3.

O Enterótipo 2 foi achado enriquecido de *Prevotella*, que co-ocorreu com *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Desulfovibrio* e os gêneros não identificados da família Lachnospiraceae. Podem atuar em sinergia para degradar glicoproteínas mucinas presentes na camada mucosa do intestino, já que *Prevotella* é um conhecido degradador da mucina e o *Desulfovibrio* pode aumentar a etapa de dessulfatação da mesma, que limita a velocidade, removendo o sulfato. Neste grupo encontramos vias enriquecidas para biossíntese de tiamina, tetraidrofolato, ascorbato (ARUMUGAM *et al.*, 2011). Quando comparado com o enterótipo 3, o enterótipo *Prevotella* se mostrou significativamente mais sacarolítico. Esta relação confirma a característica da prevalência de *Prevotella* com a dieta dos povos caçadores e coletores (VIEIRA-SILVA *et al.*, 2016). No estudo de Vandeputte *et al.* (2016), o enterótipo *Prevotella* associou-se a fezes moles e trânsito intestinal mais rápido, o que pode estar relacionado ao maior consumo de fibras alimentares na dieta, associado positivamente a este gênero.

O Enterótipo 3 apresentou-se enriquecido com *Ruminococcus*, que co-ocorreu com *Akkermansia*, *Alistipes*, *Klebsiella*, *Escherichia/Shigella*, *Dialister*, *Mitsuokella*, *Methanobrevibacter*, *Eggerthella*, família *Ruminococcaceae*, *Subdoligranulum*, *Coprococcus*, *Collinsella*, *Blautia*, *Eubacterium* e *Dorea*. Tanto *Ruminococcus* como *Akkermansia* são conhecidos por compreenderem espécies capazes de degradar mucinas. Também é enriquecido em transportadores de membrana, principalmente de açúcares, indicando a ligação eficiente da mucina e sua subsequente hidrólise, bem como a absorção dos açúcares simples (ARUMUGAM *et al.*, 2011). No estudo feito por Vieira-Silva *et al.* (2016), o enterótipo 3 foi significativamente associado à maior capacidade lipolítica quando comparado com o enterótipo Prevotella.

Em seu estudo Vandeputte *et al.* (2016) verificaram que os dados eram “melhor” separados em apenas 2 enterótipos: *Ruminococcaceae-Bacteroides* (RB) e *Prevotella* (P). RB, por sua característica proteolítica e lipolítica, se relacionou com a lentidão do trânsito intestinal e a eliminação de fezes firmes. Dentro do enterótipo RB, as populações de *Methanobrevibacter*, *Akkermansia*, *Oxalobacter* e *Butyricimonas* aumentam com a firmeza das fezes (e, portanto, são mais prevalentes em indivíduos de trânsito lento) (VANDEPUTTE *et al.*, 2016). Tempos de trânsito intestinal aumentados, não só permitem a proliferação de espécies de crescimento mais lento, mas o esgotamento progressivo da disponibilidade de água, que também induz à diversificação de nicho e, portanto, diversificação filogenética e redundância funcional potencialmente aumentada (VIEIRA-SILVA *et al.*, 2016).

Os gêneros enriquecidos indicam que os enterótipos usam diferentes rotas para gerar energia a partir de substratos fermentáveis disponíveis no cólon, uma reminiscência de potencial especialização em nichos ecológicos. Além da conversão de carboidratos complexos em substratos absorvíveis, a microbiota intestinal também é benéfica para o hospedeiro humano ao produzir vitaminas. Este enterótipo encontra-se enriquecido pelas vias de biossíntese de heme, diversos metais (cobalto, níquel), açúcares, além de oxidação de metano. Portanto, diferentes combinações de cadeias tróficas microbianas com um provável impacto nas inter-relações sinérgicas com os hospedeiros humanos (ARUMUGAM *et al.*, 2011).

Em uma reanálise, as amostras utilizadas por Arumugan (2011) e outras amostras de cinco continentes, Gorvitovskaia, Holmes e Muse (2016) revisaram a proposta dos enterótipos, referindo que, na realidade, as projeções são um ‘continuum’ de valores criados a partir de uma mistura das comunidades dominantes de *Prevotella*, *Bacteroides*, Clostridiales e *Bifidobacterium*.

Os métodos de ordenação supervisionados podem levar a falsos agrupamentos, quando o número de características nos dados (aqui gêneros microbianos) é muito maior do que o número de amostras, como é o caso na maioria dos estudos de microbioma intestinal humano. No geral, esses estudos descobriram que o peso da evidência não apoiava a classificação de microbiomas intestinais humanos em enterótipos discretos e estáveis, e, em seguida propõem o termo “biomarcador” para estes gêneros bacterianos.

É fundamental compreender que as associações do microbioma são complexas e raramente unidirecionais, sendo que uma influência externa pode desencadear uma mudança (desequilíbrio) que perturba um estado equilibrado do microbioma adaptado, e, devido a esta mudança, o microbioma retroalimenta o hospedeiro de diversas maneiras (ex. produção de metabólitos que são absorvíveis pelo hospedeiro), o que muitas vezes induz estados de doença e uso de medicações (SCHMIDT, RAES; BORK, 2018).

Por desenvolver papéis críticos, os abundantes e diversos membros microbianos medeiam a relação entre saúde e doença. Vários distúrbios clínicos estão associados a alterações nas comunidades microbianas do hospedeiro, como: obesidade, desnutrição, diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), doenças inflamatórias agudas e crônicas (pele, boca, trato intestinal, cardiovasculares), artrite, diferentes tipos de câncer, parto prematuro (COSTELLO *et al.*, 2012; SCHMIDT, RAES; BORK, 2018; LLOYD-PRICE *et al.*, 2019; SERRANO *et al.*, 2019; FETTWEIS *et al.*, 2019; TILG *et al.*, 2019).

2.2.2.1 Índice de Massa Corporal (IMC)

O mundo está vivendo a transição nutricional, e a obesidade é um dos lados do fardo duplo da desnutrição. Hoje mais pessoas são obesas do que abaixo do peso, em todas as regiões, exceto África Subsaariana e Ásia. A obesidade e o sobrepeso já foram considerados problemas apenas de países de alta renda, mas agora estão aumentando, dramaticamente, em países de baixa e média renda, particularmente em ambientes urbanos. A grande maioria das crianças com excesso de peso ou obesas vivem em países em desenvolvimento, onde a taxa de aumento foi acima de 30% maior do que a dos países desenvolvidos (WHO, 2021).

O excesso de peso e a obesidade são definidos como acúmulo de gordura anormal ou excessiva, o que representa um risco para a saúde. Os pontos de corte para o índice de massa

corporal (IMC) elevado são: acima de 25kg/m² é considerado sobrepeso, e mais de 30kg/m², obesidade. A questão cresce em proporções epidêmicas. Em 2017 mais de 4 milhões de pessoas morreram como resultado de estarem com sobrepeso ou obesidade. As taxas continuam a crescer tanto em adultos quanto em crianças. De 1975 a 2016, a prevalência de crianças e adolescentes (5 a 19 anos) com sobrepeso ou obesidade aumentou mais de quatro vezes, passando de 4% para 18% em todo o mundo (WHO, 2021).

A obesidade é um estado sem precedentes para a espécie humana, resultante de uma incompatibilidade entre a biologia evolutiva e o ambiente moderno. Uma das interações, onde o microbioma intestinal humano tem sido estudado extensivamente é em sua relação ao desenvolvimento da obesidade, pois podem desempenhar um papel no metabolismo humano e na adiposidade. Por serem adquiridos ambientalmente, constituem parte do ambiente humano que pode contribuir para o estado obeso (LEY, 2010).

No início da década de 1950 os cientistas descobriram, em estudos animais, que utilizar doses baixas de antibióticos aumentava a taxa de crescimento e a capacidade de converter os alimentos em massa corporal. Quanto mais jovens os animais, mais fortes eram os efeitos. Como estes efeitos eram reproduzíveis em aves, bovinos e suínos, este uso foi generalizado através das rações animais. O uso foi proibido na União Européia devido à disseminação de bactérias resistentes a antibióticos. Especula-se que, nos humanos, o uso de antibióticos, desde cedo na infância, possa ter alterado a composição da microbiota intestinal e contribuído diretamente para a epidemia de obesidade em países desenvolvidos (BLASER; FALKOW, 2009).

Desde os primeiros estudos publicados esta relação tem sido investigada. Estudos iniciais, em modelos animais, identificaram que o microbioma dos indivíduos obesos apresenta um enriquecimento em genes envolvidos na extração energética, quando comparado com os indivíduos magros. Um microbioma com maior eficiência de extração de energia resulta em menos energia sobrando nas fezes e maiores níveis de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) no ceco. Em modelos animais, quando os conteúdos luminiais do ceco, de camundongos obesos e camundongos magros, foram fornecidos a receptores animais sem germes magros, os que receberam os microrganismos dos doadores obesos ganharam mais peso, apesar da equivalente ingestão de alimentos (LEY *et al.*, 2005; TURNBAUGH *et al.*, 2006; LEY, 2010). Outra contribuição interessante, vinda de estudos de intervenção em modelos animais obesos, é que os animais com a mesma proporção de gordura corporal, mantidos em jejum por mais tempo, possuem uma maior proporção de Bacteroidetes no

ceco do que os que fazem menores períodos de jejum. Sendo assim, a frequência com a qual a comida entra no intestino e o tempo de trânsito intestinal podem ser fatores importantes a serem considerados (LEY, 2010).

Em humanos, os estudos de Ley *et al.* (2006) acompanharam indivíduos obesos em dieta de restrição de carboidrato ou restrição de gordura durante 1 ano. Antes da restrição alimentar as pessoas possuíam menor abundância relativa de Bacteroidetes e maior abundância de Firmicutes. Com o tempo de restrição alimentar e perda de peso, a abundância de Bacteroidetes aumentou, reduzindo a de Firmicutes, independentemente do tipo de dieta restritiva adotada, revelando que a proporção entre o Filo dos Firmicutes e Bacteroidetes é importante para na perda de peso. Mas a ligação entre obesidade e a microbiota é mais sofisticada do que a simples razão Bacteroidetes/Firmicutes em nível de filo identificada inicialmente (CLAESSON *et al.*, 2010).

Estudos em humanos com pares de gêmeos adultos monozigóticos do sexo feminino e dizigóticos concordantes com o estado de obesidade ou eutrofia foram comparados, e, quando possível, também com suas mães. Verificou-se que os gêmeos monozigóticos foram mais concordantes para o IMC corporal e para o ganho de peso, quando superalimentados, do que os gêmeos dizigóticos. Nas análises também foi possível identificar que, independente do gene bacteriano analisado, os indivíduos da mesma família (gêmeo e seu co-gêmeo, ou gêmeos e sua mãe) tinham uma estrutura comunitária bacteriana mais similar do que indivíduos não relacionados. E compartilhavam mais espécies bacterianas. No geral, as amostras fecais do mesmo indivíduo, coletadas no tempo inicial e após 57 dias, apresentaram-se mais parecidas do que com as amostras de familiares ou indivíduos não relacionados, demonstrando que mudanças temporais de curto prazo, na estrutura comunitária dentro de um indivíduo, são menores comparadas às diferenças interpessoais. As comparações entre todos os participantes mostraram que a obesidade pode ser associada à redução da diversidade bacteriana e à redução da representação dos Bacteroidetes. Além disso, o microbioma diferiu entre os hospedeiros obesos e magros da mesma forma que no modelo animal para obesidade, nos quais os microbiomas dos indivíduos obesos apresentavam-se enriquecidos em categorias de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídios (TURNBAUGH *et al.*, 2008; LEY, 2010).

Após estes estudos muitos outros foram realizados com resultados diversos e conflitantes. Entretanto, as metodologias aplicadas não foram padronizadas e receberam críticas de sua eficiência para coletar a real representatividade dos taxons microbianos em amostras de fezes

humanas. Uma das dificuldades é a transposição de estudos animais para humanos, pois já é bem estabelecido que os estudos em animais são menos variáveis e mais fáceis de controlar, do que os realizados em humanos. Uma das formas encontradas, para verificar se a microbiota intestinal pode predispor o hospedeiro ao ganho ou a redução de peso, foram os estudos que realizaram transplantes de microbiota intestinal conhecida de indivíduos obesos para modelos animais magros livres de germes (*germ-free*) e, como resposta, os animais recebedores da microbiota dos indivíduos obesos obtiveram maior ganho de peso (LEY, 2010).

Um estudo de acompanhamento prospectivo, realizado com crianças, indicou que, aqueles que alcançaram o sobrepeso com a idade de 7 anos, possuíam em seu microbioma menores níveis de *Bifidobacteria* e maiores níveis de *Staphylococcus aureus* na infância, comparados aos que permaneceram magros (KALLIOMÄKI *et al.*, 2008).

Santacruz *et al.* (2009) realizaram estudo de intervenção em adolescentes com excesso de peso, com o objetivo de verificar as diferenças na microbiota intestinal, e observaram que apesar da mesma conduta de restrição alimentar e exercícios físicos a perda de peso variou. Em todos os adolescentes houve aumento no grupo *Bacteroides fragilis* e nos *Lactobacillus* e uma redução em *Clostridium coccoides*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium adolescentis*. Nos que obtiveram uma maior perda de peso, o aumento de *B. Fragilis* e *Lactobacillus* foi maior, quando comparada com os que perderam menos peso, assim como a redução foi mais expressiva nas outras cepas bacterianas. De acordo com Ley (2010), os estudos com crianças e com adolescentes demonstram que a microbiota é diferenciada entre as pessoas antes da perda de peso, o que sugere que as intervenções terapêuticas voltadas para a reformulação da microbiota intestinal podem ser benéficas para perda de peso, bem como preventivas para o ganho de peso.

Estudo de coorte realizado por Jumpertz *et al.* (2011), em humanos obesos e magros verificou como a estrutura do microbioma é afetada pela mudança no aporte de nutrientes, e como ela respondeu ao aproveitamento energético dos mesmos. A alteração da carga de nutrientes induziu rápidas mudanças na estrutura da microbiota intestinal. Foi possível constatar que um aumento de 20% na abundância relativa de Firmicutes e uma diminuição correspondente em Bacteroidetes representou um aumento no aproveitamento energético em 150 kcal. Quanto maior o nível de alimentação excessiva em indivíduos magros, maior a redução na perda de energia das fezes, resultando em uma maior absorção energética. Sendo assim a carga de nutrientes é uma chave variável que pode influenciar a estrutura do microbioma intestinal em curto prazo. Portanto,

as associações observadas entre os microrganismos e a absorção de nutrientes indicam um papel possível da microbiota do intestino humano na regulação da absorção de nutrientes.

A superalimentação *per se* já é um fator de processamento e absorção de maior quantidade de nutrientes e calorias. Mas esta prática ainda possibilita a mudança na estrutura do microbioma intestinal, levando a um maior processamento de nutrientes e aumento na quantidade de calorias disponíveis e absorvíveis pelo hospedeiro. Contribuindo, assim, para o quadro de ganho de peso e, possivelmente, obesidade.

Por outro lado, a redução calórica significativa também tem seu papel na alteração do microbioma intestinal. Esta é uma prática recorrente na atualidade: a prescrição de dietas de muito baixo aporte energético, do inglês Verry Low Calorie Diet (VLCD). Um estudo realizado por Schwartzberg *et al.* (2017), com mulheres pós-menopáusicas com excesso de peso ou obesidade, fez uma intervenção para perda de peso durante 16 semanas, divididas em 3 fases (Fase 1: 8 semanas de VLCD de 800kcal por dia; Fase 2: 4 semanas de dieta convencional de baixa caloria, denominada CONVD e Fase 3: 4 semanas de manutenção de peso) e outro grupo semelhante com dieta de manutenção. Na microbiota intestinal a restrição calórica na fase VLCD foi semelhante aos efeitos de jejuns de longo prazo ou nutrição parenteral, com a redução significativa do nível de colonização microbiana, medidos por conteúdo de DNA fecal e leitura de genes 16S rRNA. Esta redução também foi observada em relação a produção de SCFAs, com diminuição significativa de acetato, butirato e valerato na amostra de fezes na fase VLCD, com um leve aumento na fase seguinte de baixa caloria. Uma inspeção detalhada dos gêneros preditivos mostrou que a VLCD aumentou o crescimento de bactérias capazes de forragear em glicanos do hospedeiro (*Akkermansia*), em detrimento de bactérias especializadas para o metabolismo de polissacarídeos vegetais (*Roseburia*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*). A análise metagenômica mostrou que a estrutura da comunidade microbiana do intestino foi temporariamente perturbada após a fase VLCD. As reconstruções metabólicas identificaram 88 vias, 100 módulos e 1.502 (Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas - KEGG) ortologias (KOs), cujas abundâncias diferiam entre o VLCD e as amostras de linha de base. A comparação das amostras de linha de base e CONVD mostrou diferenças mais modestas, com apenas oito KOs diferencialmente abundantes. As mudanças observadas no potencial metabólico da comunidade microbiana eram reversíveis, sendo que os KOs que mudaram em abundância durante o VLCD foram revertidos durante o CONVD.

Embora a abundância relativa de genes envolvidos na biossíntese de SCFA tenha aumentado no VLCD, isso foi insuficiente para compensar a diminuição geral na colonização microbiana.

Como continuação do estudo (SCHWARTZENBERG *et al.*, 2017), a microbiota de 5 dos indivíduos que mais perderam peso durante a intervenção foi transplantada para camundongos livres de germes, tanto o microbioma basal (pré-dieta) quanto pós-VLCD, revelando diferenças estáveis entre os grupos. A capacidade funcional nas vias centrais do carbono, ácido graxo, e o metabolismo dos aminoácidos foi alterada pela restrição calórica. Os que receberam a amostra de microbioma pós-VLCD perderam mais peso do que os pré-dieta ou controles livres de germes, o que foi significativo estatisticamente, e a perda foi mantida por 21 dias após a colonização mesmo sem diferenças alimentares entre os grupos. A gordura corporal também foi significativamente afetada nos camundongos pós-VLCD, visto que não houve aumento de adiposidade após a colonização, como é tipicamente encontrado nos estudos. A densidade calórica das fezes dos que receberam o microbioma pós-VLCD foi significativamente maior dos que receberam o pré-dieta. Assim, o microbioma intestinal humano pós-dieta contribuiu para a perda de peso, em parte ao diminuir a eficiência da absorção de energia da dieta. No entanto, as mudanças induzidas pelo microbioma no gasto energético do hospedeiro e /ou na taxa metabólica de repouso ainda precisam ser exploradas. A microbiota dos camundongos que receberam o microbioma pós-VLCD mostrou-se enriquecido com *Clostridium difficile*, com o seguimento do estudo, revelando que neste grupo houve capacidade reduzida de restringir o crescimento desta bactéria quando comparada ao que recebeu o pré-dieta, sendo que a exposição ao *C. difficile* foi semelhante no ponto inicial.

Para testar se *C. difficile* era suficiente para replicar os resultados de perda de peso e o fenótipo metabólico, foi isolada a cepa não virulenta de *C. difficile* JBZPo1. Foram divididos em 2 grupos, um onde a colonização foi apenas com amostra de microbioma pós-VLCD e a mesma amostra adicionada de cepas de JBZPo1. Viu-se que a perda de peso aconteceu em ambos os grupos, mas que os que receberam as cepas não virulentas adicionais perderam mais peso que se manteve durante todo o experimento. Também houve melhora na tolerância à glicose. Entretanto, a adiposidade final dos que receberam as cepas foi maior do que os controles. Não houve mudança comportamental, postural, nem na consistência das fezes entre os grupos. Amostras histológicas não demonstraram sinais de colite associada a *C. difficile*, mas sim uma menor infiltração de neutrófilos. Entretanto as alterações na dieta podem levar a diferenças de expressão de traços de virulência de *C. difficile* (SCHWARTZENBERG *et al.*, 2017).

Estudos de migração levantam a questão de que a mudança de ambiente e alimentação, com o aumento do aporte de nutrientes e calorias, pode contribuir muito com o desenvolvimento da obesidade e de outras doenças crônicas em uma população, que normalmente, não seria atingida por estes desfechos. Esta mudança parece acometer muito mais indivíduos refugiados, que são mais suscetíveis ao ganho de peso rápido, provavelmente pela insegurança alimentar a que foram expostos anteriormente, com escassez de nutrientes, e a exposição ao novo estilo de vida após a migração (OLSON *et al.*, 2017; SONNENBURG; SONNENBURG, 2018; VANGAY *et al.*, 2019). Como abordado anteriormente, o microbioma intestinal é fortemente influenciado pela dieta de longo prazo, mas também pode responder rapidamente a mudanças drásticas na dieta (TURNBAUGH *et al.*, 2008; JUMPertz *et al.*, 2011; VANGAY *et al.*, 2019)

Sonnenburg e Sonnenburg (2019) sugerem uma representação gráfica adaptada das funções desempenhadas pelo microbioma exposto na figura 3. Os dados atuais sugerem que, junto com a mudança na composição da microbiota industrializada, certos serviços sistêmicos podem ser perdidos ou desequilibrados, resultando em estados subótimos da fisiologia ou doença do hospedeiro. Uma compreensão mais sutil de quais serviços são benéficos, e em que contexto, será possibilitada pelo perfil longitudinal de alta dimensão do microbioma e da biologia do hospedeiro, combinado com o monitoramento de longo prazo da saúde em humanos, como mostrado na Figura 8.

Figura 8 – Esquema dos serviços sistêmicos que se mostram alterados pela estrutura do microbioma da população industrializada.

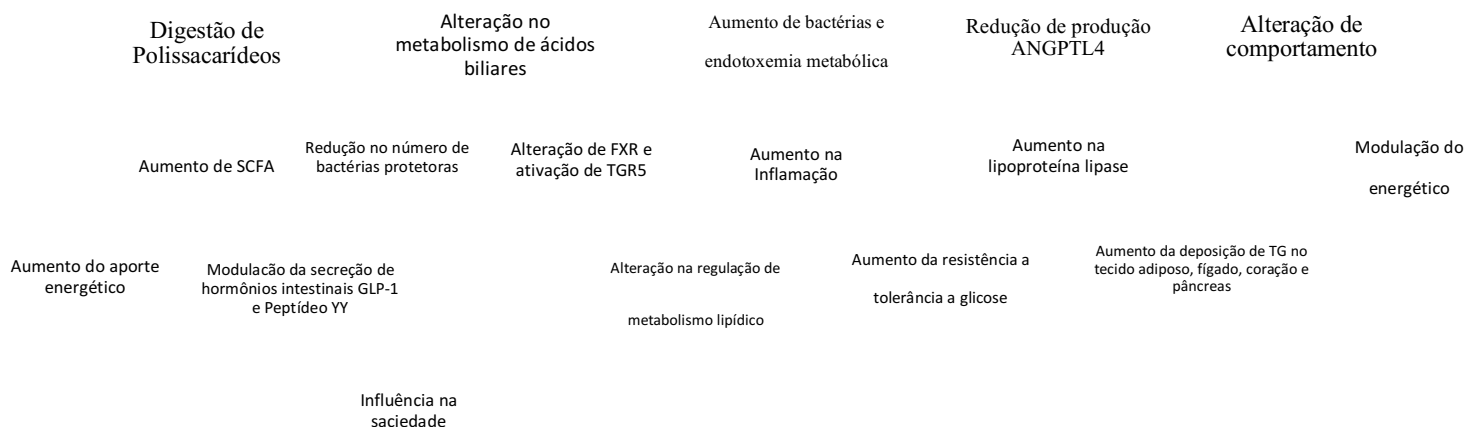


Fonte: Adaptado de Sonnenburg e Sonnenburg (2019).

Leong *et al.* (2017) propõe um esquema que relaciona o microbioma intestinal com os diversos desfechos relacionados à obesidade e à síndrome metabólica, como pode ser visto na figura 9. Alguns pontos expostos na figura serão abordados a seguir nesta revisão.

Figura 9 – Organograma da proposta dos papéis do microbioma intestinal na obesidade. ANGPTL4 (angiopoietina-likeprotein4); FXR (receptor nuclear de farnesóide do receptor X); GLP-1 (peptídeo semelhante a glucagon); LPS (lipopolissacarídeo); SCFA (ácidos graxos de cadeia curta); e TGR5 (Receptor de ácido biliar acoplado à proteína G-1).

Alterações no Microbioma Intestinal



Fonte: Adaptado de Leong *et al.* (2017).

Uma das atividades simbióticas importantes do microbioma intestinal é produzir ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs – sigla em inglês), a partir dos componentes da dieta que escapam da digestão no intestino delgado, como a fibra dietética, e estes fornecem energia adicional para o hospedeiro (SCHWIERTZ *et al.*, 2010). Ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) compreendem de 1-6 ânions baseados em carbono produzidos durante a fermentação bacteriana, das quais, o acetato (C2), o propionato (C3) e o butirato (C4) são mais abundantemente produzidos. O SCFA é produzido naturalmente dentro do cólon, por fermentação de carboidratos não digeríveis, tanto dietética quanto endógena, e proteína acessível à microbiota (GILL *et al.*, 2018).

Cerca de 60 a 70% do fornecimento de energia para o epitélio do cólon intestinal deriva dos SCFA, particularmente do butirato. O propionato é largamente reaproveitado pelo fígado e é um bom precursor da gliconeogênese, liponeogênese e síntese de proteínas. O acetato entra na circulação periférica a ser metabolizada por tecidos periféricos, e é um substrato para a síntese de colesterol (SCHWIERTZ *et al.*, 2010).

A fibra dietética definida pelo Codex-Alimentarius e pela Organização Mundial da Saúde inclui todos os carboidratos não digeríveis, como os polissacarídeos não-amido (celulose, hemiceluloses e pectinas, amido resistente) e oligossacarídeos não digestíveis (inulina e oligofrutose, bem como ligninas). Assim, os alimentos ricos em fibra dietética incluem os grãos integrais, leguminosas, legumes, frutas, nozes e sementes (GILL *et al.*, 2020).

Evidências epidemiológicas sugerem que há uma associação entre consumo dietético de fibra e redução do risco de desenvolver doença cardiovascular, diabetes e câncer de cólon. O SCFA pode desempenhar um papel em conferir tais efeitos, afetando diretamente a atividade celular e a função. Um forte corpo de pesquisa, principalmente em modelos animais, demonstra que o SCFA afeta os resultados da saúde e da doença (GILL *et al.*, 2018).

Os SCFAs, principalmente o butirato, podem regular a microbiota intestinal, modulando os valores de pH do lúmen que são benéficos às bactérias produtoras de SCFAs. Ainda podem preservar a hipóxia epitelial e limitar o crescimento excessivo de bactérias dependentes da respiração de nitrato para manter a homeostase intestinal. Estudos *in vitro* de células intestinais humanas mostraram que o butirato pode promover o reparo da mucosa intestinal e inibir a formação de citocinas inflamatórias, exercendo assim um efeito anti-inflamatório e antitumoral, incluindo a redução de secreção de fator de necrose tumoral (TNF) em células epiteliais intestinais e a indução da diferenciação e apoptose de células tumorais (ZHOU *et al.*, 2021).

Embora esteja claro que os SCFAs induzem células T reguladoras (Tregs) do cólon, os detalhes específicos ainda não foram completamente esclarecidos. Mas já se sabe que os SCFAs atuam pela inibição da histona desacetilase, o que leva ao aumento da acetilação e da expressão de Foxp3, inibem a sinalização de NF- κ B em colonócitos, reduzindo a inflamação intestinal e contribuindo com a integridade de barreira acetato, butirato e propionato, ativam receptores de proteína G que modulam hormônios metabólicos importantes como peptídeo YY e GLP-1 (ARPAIA *et al.*, 2013; SURANA; KASPER, 2014; HOLMES *et al.*, 2020).

No estudo realizado por Schwartz *et al.* (2010) com 98 humanos magros, com sobrepeso ou obesos indicou que a quantidade total de SCFA foi 20% maior no grupo de obesos do que no grupo dos indivíduos magros. Os principais SCFA encontrados nas amostras de fezes foram acetato, propionato, butirato e valerato, bem como isovalerato e isobutirato. O maior aumento foi visto para propionato com 41% ($p = 0,002$), seguido por butirato (28%, $p = 0,095$). Um aumento numérico de concentrações de valerato (21%), e acetato (18%) foi observado, mas não em iso-SCFAs. Tanto em obesos quanto em magros a abundância relativa foi maior nos filos de Firmicutes e Bacteroidetes. A proporção de Firmicutes para Bacteroidetes mudou em favor dos Bacteroidetes para os indivíduos com excesso de peso e obesos. Este estudo demonstra uma relação controversa em relação aos anteriores na distribuição dos filos bacterianos, na questão do excesso

de peso e obesidade, demonstrando a complexa relação do microbioma intestinal. Já na questão da produção de SCFAs concorda com a literatura anterior.

Em sua revisão Cao *et al.* (2019) demonstram os conflitos na literatura científica ao que se refere às relações entre os filos Firmicutes e Bacteroidetes, e concluem que a microbiota intestinal obesogênica, (como a que possui Firmicutes, certos Bacteroidetes, *Rhizobium*, *Lactococcus* e *Clostridium*) poderia promover o desenvolvimento da obesidade, principalmente por meio da produção de SCFAs como butirato, fornecendo energia extra para o hospedeiro e a indução de inflamação de baixo grau causada pelos metabólitos da microbiota intestinal. Deve ser apontado, que os efeitos dos SCFAs na obesidade foram extensivamente estudados em animais, mas, poucas conclusões foram tiradas de estudos em humanos. Portanto, mais ensaios clínicos são necessários para testar e verificar seus efeitos em humanos (CAO, 2019).

As pesquisas em modelos animais encontraram benefícios com o uso de suplementos como acetato, butirato e propionato para melhorar a resistência à insulina, e reduzir a inflamação ligada à obesidade. Entretanto, os estudos em crianças que estão em sobrepeso e obesidade, quanto à eficácia do uso de SCFAs em forma de suplementos para a redução de peso corporal são conflitantes. Os efeitos de fibras prebióticas em adultos mostra uma variação interindividual na concentração de SCFA nas fezes que pode refletir as diferenças na produção de SCFAs pela microbiota do hospedeiro ou na metabolização intestinal do hospedeiro, como o potencial de absorção dos SCFAs, além da ocorrência concomitante de outras condições de doenças crônicas em indivíduos obesos adultos e o uso de medicação para tratamento das mesmas (HOLMES *et al.*, 2020).

Estudo *in vitro*, utilizando amostras de fezes de 17 indivíduos de 10 a 18 anos com IMC médio de 34.9kg/m² (obesidade) e fibras prebióticas (dextrina, inulina, FOS, GOS, XOS), revelou que a produção de SCFAs estava relacionada com a abundância relativa de 18 gêneros bacterianos e 1 gênero Archea: *Methanobrevibacter* (Archea), *Akkermansia*, *Ruminococcus*, *Coprostanoligenes*, *Parabacteroides*, *Butyricimonas*, *Tyzzarella*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillus*, *Coprococcus* e *Collinsella* e *Lachnospiraceae*. Entretanto o tipo do prebiótico estimulou de forma diferente cada um dos gêneros identificados, sendo que a dextrina foi o prebiótico menos seletivo, resultando em produção de SCFAs em maior quantidade nos primeiros 9 gêneros. Os *Lactobacillus*, *Coprococcus* e *Collinsella* produziram SCFAs com eficiência apenas a partir de XOS. O uso de GOS reduziu a produção de SCFAs em *Lactobacillus* e foi o único a produzir em

maior quantidade no gênero *Lachnospiraceae*. Sendo assim, nem todos os prebióticos são igualmente acidogênicos. Também deve ser levado em consideração que, em estudos *in vitro*, muitos fatores que podem afetar a produção de SCFAs *in vivo* não são replicados, além de fatores relacionados ao acondicionamento das amostras (HOLMES *et al.*, 2020).

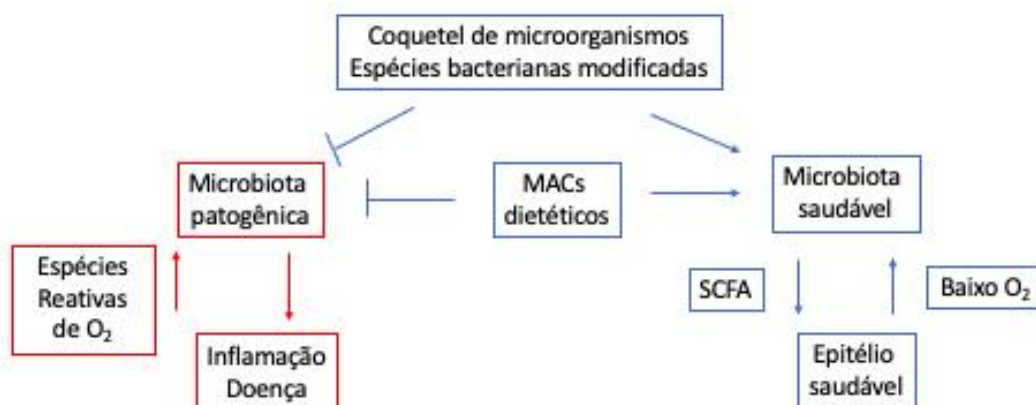
Fatores, como a inflamação metabólica de baixo grau relacionada à obesidade, à síndrome metabólica e à resistência à insulina, estão diretamente conectados às respostas do sistema imune, como, por exemplo, através de aumento de citocinas pró-inflamatórias. As bactérias intestinais podem induzir este processo através dos lipopolissacarídeos (LPS), componentes essenciais das paredes celulares de bactérias gram-negativas, como a dos Bacteroidetes (LEY, 2010; LEONG *et al.*, 2017).

Revisando o uso de cepas probióticas, utilizadas de forma terapêutica, Cao *et al.* (2019) citam que algumas espécies de bactérias têm mostrado efeito anti-obesidade, como *Bifidobacterium* (*B. lactis* 420, *B. pseudocatenulatum* CECT 7765, *B. bifidum*, *B. adolescentis* IM38, *B. MKK4*, *B. breve* B-3) e subespécies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. acidophilus* 031CE, *L. sakei* OK67, *L. reuteri* GMNL-263, *L. plantarum* Ln4, *L. JBD301*, *L. casei* Shirota, *L. gasseri* BNR17). Coletivamente, bactérias intestinais anti-obesidade, como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroidetes* e *Akkermansia muciniphila*, podem induzir perda de peso de várias maneiras, incluindo redução da permeabilidade intestinal, aumento da integridade da mucosa intestinal com níveis elevados de proteínas de junção rígida, modulando a expressão dos principais reguladores envolvidos na lipogênese, atenuando a inflamação intestinal com níveis reduzidos de NF- κ B, TNF e IL-1 β , reduzindo a resistência à insulina, e promovendo o escurecimento da gordura adiposa branca. Entretanto, algumas espécies de *Lactobacillus* têm mostrado efeito de ganho de peso em animais e humanos, como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus ingluviei* (CAO *et al.*, 2019).

As estratégias de longo prazo, para gerenciar a microbiota benéfica, incluem abordagens de precisão para adicionar coquetéis definidos de microrganismos, espécies bacterianas modificadas e melhorar a qualidade do habitat do ecossistema. Por exemplo, aumentar os carboidratos acessíveis para a microbiota (MACs dietéticos - que são os alimentos que possuem naturalmente carboidratos complexos e fibras) estimula o crescimento comensal e fornece produtos finais de fermentação, como SCFAs, ao epitélio, o que pode ajudar a manter as tensões de oxigênio

mais baixas no intestino e prevenir o crescimento de anaeróbios facultativos com potencial patogênico (SONNENBURG; SONNENBURG, 2019).

Figura 10 – Esquema dos efeitos benéficos do uso de microrganismos e carboidratos não digeríveis na modulação da microbiota intestinal para um desfecho saudável.



Fonte: Adaptado de Sonnenburg e Sonnenburg (2019).

Outro papel metabólico, desempenhado pelo microbioma intestinal relacionado ao desfecho de obesidade e na síndrome metabólica, é a regulação do metabolismo lipídico do hospedeiro, como na regulação da proteína 4, semelhante à angiopoietina (ANGPTL4), conhecida como FIAF, ou fator induzido por jejum. A FIAF regula a oxidação de ácidos graxos no tecido muscular e no tecido adiposo. Quando uma microbiota normal de camundongos é administrada em animais livres de germes, a produção de FIAF é suprimida no intestino e uma maior proporção de triglicerídeos é armazenada no tecido adiposo (BACKHED *et al.*, 2007; LEY, 2010; LEONG *et al.*, 2017).

2.2.2.2 Idade

Quando pensamos na questão de idade e microbioma intestinal, vemos que, desde o início do desenvolvimento intrauterino, existe uma influência importante onde a ecologia microbiana materna pode afetar a gravidez, o desenvolvimento fetal e a saúde futura da prole. Medidas em relação ao prognóstico e diagnóstico pré-natal, assim como intervenções terapêuticas

podem ser tomadas, visando a microbiota materna para orientar o desenvolvimento fetal saudável, evitar o nascimento prematuro e outros resultados negativos (CHARBONNEAU *et al.*, 2016; SERRANO *et al.*, 2019; PROCTOR *et al.*, 2019).

Há uma grande discussão na literatura científica sobre a colonização do feto ainda dentro do útero, com questões relacionadas inclusive às definições dos termos. Os pesquisadores referem que é possível encontrar algum DNA ainda na placenta ou líquido amniótico, mas a existência de uma colonização é improvável, e que alguns desfechos relacionados à presença destes está relacionado a resultados gestacionais adversos ou que ainda possam influenciar o feto em desenvolvimento, através da exposição a produtos microbianos. Também, para provar que existe um microbioma viável, este precisa atender a alguns quesitos, como estabilidade ao longo do tempo, capacidade reprodutiva no local e ser metabolicamente ativo, o que não foi demonstrado até o momento. Um dos pontos que suporta a esterilidade intrauterina são os mamíferos gnotobióticos usados em estudos de microbioma, pois não seria possível obtê-los se não existisse a esterilidade. Mas provar a esterilidade é uma tarefa de dificuldade extrema (BLASER *et al.*, 2021).

Quanto à influência no modo de parto, em uma revisão Gritz e Bhandari (2015) relataram que os bebês nascidos de parto vaginal apresentam colonização intestinal que reflete a flora vaginal materna (*Lactobacillus* e *Prevotella*). Bebês nascidos de parto cesáreo são colonizados por espécies epidérmicas (*Clostridium*, *Staphylococcus*, *Propionobacterium* e *Corynebacterium*) e têm deficiência de anaeróbios com menor número de *Bacteroides* e *Bifidobacterium* quando comparados a bebês nascidos de parto normal. Assim, o modo de parto parece ter influência na diversidade e função da microbiota que pode durar meses, e talvez mais, após o nascimento.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Vänni *et al.* (2021) com duas coortes prospectivas de crianças finlandesas, uma denominada “modo de parto” com 212 recém-nascidos recrutados na sala de parto, que foram divididos em dois grupos com base na via de parto (normal ou cesariana). A outra coorte utilizada por este estudo foi denominada de “antibióticos perinatais”, em que os bebês finlandeses foram recrutados no primeiro dia após o nascimento e divididos em dois grupos (controles ou expostos a antibióticos). A exposição intraparto e perinatal a antibióticos, enriqueceu as vias associadas à glicólise e ao metabolismo da pirimidina, enquanto as vias associadas ao folato e ao metabolismo da biotina diminuíram, além de alterar as vias de

produção de ácidos graxos. A abundância relativa média de *Bacteroides* diminuiu em crianças nascidas de cesariana e expostas a antibióticos perinatais. De acordo este estudo, *Bacteroides* se mostrou o principal contribuinte para várias vias previstas, relacionadas ao metabolismo da biotina, biossíntese de biotina, degradação de glicosaminoglicanos e biossíntese de ácidos graxos em crianças nascidas de parto normal ou não, expostas a antibióticos perinatais. Portanto, o modo de parto e o uso de antibióticos perinatais influenciam de forma marcante os perfis funcionais do microbioma intestinal em crianças de 1 ano de idade.

Após o nascimento ocorrem as primeiras etapas na montagem da microbiota humana, com microrganismos competindo para colonizar superfícies expostas ao ambiente dentro e fora do corpo. Este período a partir da concepção até os 2 anos de idade, que foi denominado de 1000 dias, representa uma janela crítica de crescimento e desenvolvimento na primeira infância. O processo é influenciado por muitos fatores, incluindo modo de nascimento, nutrição, ambiente, infecção e exposição a antibióticos. É marcado pela rápida maturação das vias metabólicas, endócrinas, neurais e imunológicas, que se desenvolvem em conjunto e são altamente interdependentes. Quando estas vias são desafiadas por insultos ambientais adversos, como infecção ou subnutrição, a trajetória do desenvolvimento infantil pode ser perturbada (ROBERTSON *et al.*, 2019; SONNENBURG; SONNENBURG, 2019).

A microbiota intestinal do neonato reflete a estrutura frágil das comunidades bacterianas, que se mostram instáveis devido à sua rápida variação temporal. Especificamente, devido à abundância de oxigênio no intestino neonatal, a microbiota na primeira semana de vida é frequentemente dominada por anaeróbios facultativos, como *Bifidobacterium*, alguns *Bacteroides* e *Clostridium spp*, além de Proteobacteria (por exemplo, espécies de *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, *Ruminococcus*) (ADLEBERTH; WOLD, 2009; GUARALDI; SALVATORI, 2012; SHIN; WHON; BAE, 2015; GRITZ; BHANDARI, 2015).

Diversos estudos demonstraram esta mudança ativa na microbiota dos neonatos, como por exemplo, no estudo de Yatsunenko *et al.* (2012), que utilizou 126 microrganismos intestinais como um banco de dados de referência, e pode verificar algumas mudanças importantes no microbioma com o avançar da idade, como a redução drástica de *B. longum* em todas as três populações estudadas com o aumento da idade. Durante o primeiro ano de vida os bebês mapeados apresentaram a dominância do gênero *Bifidobacterium*, embora sua proporção tenha reduzido neste período.

Outros estudos conseguiram mostrar a transferência vertical de táxons, como no que foi realizado por Pannaraj *et al.* (2017) com 107 pares de mães e bebês saudáveis, onde compararam as diferentes microbiotas do leite materno, aréolas maternas e fezes dos bebês, para estimar a contribuição do leite materno e dos microbiomas areolares da pele para o microbioma intestinal do bebê. As comunidades bacterianas foram distintas no leite, pele areolar e fezes, diferindo tanto na composição quanto na diversidade. As comunidades microbianas do intestino do bebê estavam mais intimamente relacionadas ao leite e à pele da mãe de um bebê em comparação com uma mãe aleatória. Tanto a diversidade bacteriana como as mudanças na composição foram associadas à proporção da ingestão diária de leite materno, de forma dose-dependente, mesmo após a introdução de alimentos sólidos.

Táxons específicos têm co-diversificado com os humanos, consistente com a transmissão vertical ao longo de centenas de milhares de gerações. Os microrganismos específicos, que primeiro colonizam o intestino do bebê e a sucessão subsequente da comunidade, podem influenciar irreversivelmente o desenvolvimento imunológico da mucosa e sistêmico (CHO; BLASER, 2006; SONNENBURG; SONNENBURG, 2019).

Diferenças foram observadas entre os bebês amamentados e nos que utilizam fórmula láctea, em relação à composição do microbioma intestinal (SHIN; WHON; BAE, 2015). Na composição do leite materno há os oligossacarídeos do leite humano, dentre estes a lactose faz parte de um núcleo que possui, associado, diversas combinações de glicose, galactose, N-acetil galactosamina, fucose e ácido siálico. Estes são frequentemente terminados pela fucose ou ácido siálico. Os oligossacarídeos do leite materno possuem quantidades variáveis de antígenos do grupo sanguíneo de Lewis (Le-a, Le-b, Le-x, Le-y). A tendência geral durante a lactação é uma diminuição nos níveis de oligossacarídeos totais, à medida que a mãe progride da produção de colostro para o leite maduro, com a maior queda ocorrendo no primeiro mês pós-parto. Os oligossacarídeos sialilados estão relacionados com crescimento, aumento de massa corporal magra, flexibilidade metabólica e crescimento ósseo. As fórmulas lácteas não possuem estes oligossacarídeos (CHARBONNEAU *et al.*, 2016).

Quando as populações bacterianas facultativamente anaeróbias se expandem, elas consomem o oxigênio, alterando o pH, diminuindo o potencial redox, e produzindo dióxido de carbono e nutrientes, o que cria um ambiente anaeróbio, favorecendo o crescimento de bactérias obrigatoriamente anaeróbias e um sucessivo aumento no número destas espécies (ADLEBERTH;

WOLD, 2009; GUARALDI; SALVATORI, 2012; SHIN; WHON; BAE, 2015). Com o tempo um número sucessivamente maior de espécies anaeróbias se estabelece no intestino infantil. À medida que se expandem, as bactérias facultativas não conseguem resistir à competição e às mudanças ambientais provocadas pelos anaeróbios. As facultativas diminuem até serem superadas em número pelos anaeróbios no adulto (100-1000: 1). O *C. difficile* também se desenvolve bem menos na microbiota cada vez mais complexa e se torna menos frequente no final do primeiro ano. A maturação da microbiota intestinal é um processo contínuo que dura alguns anos. Uma microbiota complexa dominada por anaeróbios obrigatórios fornece uma forte barreira contra o estabelecimento e proliferação de novas cepas bacterianas, um fenômeno denominado resistência à colonização. A resistência à colonização é pobre em neonatos, mas aumenta com a idade (ADLEBERTH; WOLD, 2009).

No estudo realizado por Yatsunenکو *et al.* (2012), com 528 indivíduos de populações diferentes (ameríndios venezuelanos, malawianos e norte-americanos), em idades de 0 a 70 anos, pode identificar que a composição filogenética das comunidades bacterianas evoluiu para uma configuração semelhante à de um adulto, dentro do período de três anos após o nascimento, em todas as três populações. A diversidade bacteriana aumentou com a idade em todas as três populações. A variação interpessoal dos táxons foi significativamente maior entre as crianças do que entre os adultos; esta descoberta foi robusta para a geografia. E as diferenças eram significativas na composição filogenética do microbioma entre os indivíduos dos diferentes países nas diferentes faixas etárias. A microbiota dos indivíduos norte-americanos acima de 3 anos mostrou-se menos diversa do que a das outras populações, mas isso não se aplicou aos mais novos. O gênero *Prevotella* mostrou-se presente em maior abundância na microbiota fecal de crianças BF do que nas EU.

O padrão alimentar na infância gera mudanças no padrão da microbiota intestinal, como observado por Filippo *et al.* (2010), que analisaram o microbioma intestinal de crianças européias (EU) e de uma vila africana de Bukina Faso (BF). O padrão dietético das crianças EU era ocidental, rica em proteína animal, açúcar, amido e gordura, e pobre em fibras (média de 5,6g fibra/dia para 1 a 2 anos e 8,4g fibra/dia para 2 a 6 anos), e foram amamentadas até 1 ano. Já o padrão dietético das crianças BF era o tradicional rural africano, com dieta pobre em gordura e proteína animal, rica em amido, fibras (10g fibra/dia para 1 a 2 anos e 14,2g fibra/dia para 2 a 6 anos) e polissacarídeos vegetais, sendo predominantemente vegetariana e foram amamentadas até

2 anos, com complemento de dieta mista. O aporte calórico variou muito entre as idades e populações, sendo maior nas crianças EU. As crianças BF possuíam maiores proporções dos filos dos Bacteroidetes e Actinobactérias e os EU maiores proporções de Firmicutes e Proteobactérias. Sendo que a diferença entre Bacteroidetes e Firmicutes delinea profundas e significativas diferenças entre os grupos.

Verificaram que, assim que o aleitamento materno é substituído por alimentos sólidos, as diferenças de microbiota entre as duas populações aumentam, refletindo na separação alimentar e ambiental que resulta na diferenciação da relação F/B. Como consequência da diferença na relação F/B nas duas populações, encontraram bactérias Gram-negativas (principalmente Bacteroidetes) mais abundantes (58,5%) do que bactérias Gram-positivas (principalmente Firmicutes) (37,4%) na população BF, enquanto Gram-positivas foram mais abundantes do que bactérias Gram-negativas (70,4% versus 29,1%, respectivamente) na população da EU (FILIPPO *et al.*, 2010).

No trabalho de Fragiadakis *et al.* (2019) com população de caçadores-coletores da Tanzânia foi avaliado o microbioma intestinal tanto dos adultos quanto dos filhos e comparados com o microbioma das populações urbanas industrializadas, em diferentes idades. Na população dos Hadza foi observado um aumento da diversidade microbiana nos primeiros anos de vida, como relatado em coortes industrializadas. Houve alto grau de similaridade no início da vida, entre as populações com alta prevalência da família Bifidobacteriaceae. No entanto, coortes com estilos de vida diferentes divergem com o aumento da idade, logo antes do primeiro ano de vida. As famílias de bactérias VANISH (Voláteis e/ou Associados Negativamente às Sociedades Industrializadas de Humanos), em populações tradicionais, se mostram de baixa prevalência no início da vida e vão elevando com a idade.

No estudo realizado por Odamaki *et al.* (2016) verificou-se que a abundância relativa de Actinobactérias diminuiu substancialmente após o desmame e continuou a diminuir com a idade. Firmicutes foi o filo mais predominante após o desmame, mas foi menos abundante em crianças com menos de 4 anos em comparação com indivíduos com mais de 4 anos. Aumentos na abundância relativa de Bacteroidetes e Proteobacteria foram observados em indivíduos com mais de 70 anos de idade. A abundância relativa de Bacteroidetes não mudou sequencialmente, mas um aumento gradual foi observado após os 70 anos de idade. A mudança na abundância relativa de Proteobacteria foi oposta à de Firmicutes (ODAMAKI *et al.*, 2016).

No estudo populacional que avaliou a variação do microbioma utilizando dados do Belgian Flemish Gut Flora Project (n = 1.106) e o holandês LifeLines-DEEP study (n = 1.135) foi possível identificar uma redução na riqueza do microbioma com o envelhecimento (FALONY *et al.*, 2016).

Não está claro quando e como a composição da microbiota muda do estágio adulto para o estágio idoso (ODAMAKI *et al.*, 2016), mas o envelhecimento do intestino está sujeito a uma série de mudanças fisiológicas que afetam a digestão e absorção dos alimentos e a função imunológica. É acompanhado por uma perda nas proporções de células T CD4⁺ virgens, o processo de inflamação é caracterizado pela ativação persistente da imunidade inata, mediada pelo fator de transcrição NF-κB. Dado o potencial de elementos da microbiota impactarem nesses processos dinâmicos é fundamental o estudo destas relações (CLAESSON *et al.*, 2010).

Não foi observada a redução da diversidade nos idosos Hadza, como acontece nas coortes industrializadas. Uma possível associação feita pelos autores é que, na sociedade urbana, os idosos vivem mais isolados dos indivíduos jovens, sendo que o declínio da diversidade associado à idade foi mais pronunciado para os idosos que vivem em instituições de longa permanência, que são mais segregados dos indivíduos mais jovens de vida livre. Já os Hadza idosos continuam morando próximos ao restante do acampamento, o que pode ajudar a manter o acesso a alimentos, atividades e micróbios característicos de indivíduos mais jovens (FRAGIADAKIS *et al.*, 2019).

Revisando a questão do envelhecimento Schmidt, Raes e Bork (2018) relataram que idosos mostram sinais de perda de diversidade, diminuição da estabilidade da composição temporal e mudanças de composição, todos associados à saúde geral, mas também a fatores de confusão como dieta e ambiente de moradia, um estilo de vida mais restrito, ou uso de medicação.

No estudo de Rampelli *et al.* (2020) foram analisados o microbioma intestinal de 4 grupos de indivíduos de faixas etárias diferentes, sendo a primeira de adultos (22 a 48 anos), a segunda de idosos jovens (65 a 75 anos), a terceira de idosos centenários (99 a 104 anos) e a quarta de idosos semi supercentenários (105 a 109 anos), com o objetivo de verificar as diferenças no microbioma intestinal de indivíduos com idade acima de 100 anos. Observaram que, de forma geral, a estrutura de composição em nível de espécie da microbiota intestinal do grupo de idosos jovens em geral coincide com a dos adultos. Por outro lado, a microbiota intestinal de centenários e semi supercentenários apresenta um rearranjo distinto em suas configurações taxonômicas, quando comparado com os mais jovens, apresentando redução de *B. uniformis*, *Eubacterium*

rectale, *C. comes*, *F. prausnitzii*, com um aumento progressivo de *E. coli*, *Methanobrevibacter smithii*, *Akermansia miciniphila* e *Eggerthella lenta*.

Quando analisaram as características funcionais observaram que os centenários e os semi supercentenários apresentavam microbioma reduzido em vias de degradação de carboidratos de forma geral e aumento das vias de degradação de xenobióticos, o que foi relacionado a mudança nos hábitos alimentares e na exposição ambiental, além de um possível acúmulo de compostos xenobióticos justamente pela vida longa. Outra diferença interessante foi no metabolismo dos ácidos graxos, sendo que nos indivíduos centenários e semi supercentenários possuíam mais leitura para o metabolismo de gorduras vegetais, já os adultos e idosos jovens para gorduras animais, revelando uma ligação entre o hábito alimentar dos mais longevos e o desfecho de longevidade. Na via dos aminoácidos encontraram maior enriquecimento nas vias de degradação de triptofano, tirosina, glicina, serina e treonina nos centenários e semi supercentenários, o que se relacionou com a redução da biodisponibilidade de triptofano no soro e aumento de metabólitos da tirosina na urina. Os genes para biossíntese de LPS também se mostraram aumentados com o envelhecimento, o que pode estar relacionado à presença de patobiontes (Enterobacteriaceae) e baixos níveis de inflamação (RAMPELLI *et al.*, 2020).

2.2.2.3 Sexo

Há algumas evidências de que o sexo pode influenciar na diversidade, composição e função da microbiota bacteriana intestinal. No estudo de Falony *et al.* (2016), foi identificado que o sexo está entre os 69 fatores correlacionados significativamente com a comunidade geral do microbioma.

Na população Hadza de caçadores-coletores da Tanzânia foi observado que há diferenças na abundância do gênero *Treponema* entre os sexos, mas não do gênero *Blautia*. Quando aplicada abordagem imparcial, usando os dados de abundância relativa com correção para hipóteses múltiplas, encontraram apenas diferença significativa no gênero *Dialister*. Quando observaram apenas as amostras da estação da chuva, o gênero estatisticamente diferente foi *Faecalibacterium* (FRAGIADAKIS *et al.*, 2019).

No estudo de Takagi *et al.* (2018), com 270 indivíduos japoneses, não encontraram diferença na diversidade alfa entre homens e mulheres, e nem entre as idades. Houve aumentos

significativos nos gêneros *Prevotella*, *Megamonas*, *Fusobacterium* e *Megasphaera* entre os homens e aumento de *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* e *Akkermansia* entre as mulheres.

Em sua revisão, Mayneris-Perxachs *et al.* (2020) relatam que os resultados de diversos estudos em humanos se mostraram contraditórios e, é possível que fatores de confusão, como questões de peso, idade, menopausa, ovariectomia ou o uso de contraceptivos orais não tenham sido adequadamente considerados. Os estudos apontam que os hormônios sexuais desempenham papéis importantes na definição do sexo biológico e propõem a investigação da microbiota intestinal deste ponto de vista (SHIN *et al.*, 2019).

No estudo realizado por Shin *et al.* (2019) foi investigada a relação entre microbioma intestinal e níveis séricos de testosterona (em 31 homens) e estradiol (em 26 mulheres) utilizando tecnologia de sequenciamento de genes 16S rRNA. Não foram encontradas diferenças em nível de filo entre o sexo feminino e masculino. Os participantes foram estratificados em três grupos: baixo, médio e alto nível hormonal e o microbioma foi analisado em função do hormônio esteróide dentro do sexo. Os resultados demonstraram que os homens e mulheres do alto grupo hormonal abrigavam comunidades microbianas mais diversas do que os dos grupos com menores níveis hormonais. Nos homens, a abundância de *Acinetobacter*, *Dorea*, *Ruminococcus* e *Megamonas* correlacionaram significativamente com os níveis de testosterona. Entre as mulheres, no grupo de estradiol elevado, houve maiores abundâncias do filo Bacteroidetes e menores de Firmicutes do que naquelas no grupo baixo. O gênero *Slackia* e *Butyricimonas* foram significativamente correlacionados com os níveis de estradiol. Estes resultados demonstram que os níveis de hormônios esteróides sexuais estão correlacionados com a composição microbiana de diversidade e intestino (SHIN *et al.*, 2019).

No estudo realizado por Mayneris-Perxachs *et al.* (2020) que iniciou com 131 indivíduos, não houveram diferenças significativas entre homens e mulheres pré e pós-menopáusicas quanto a diversidade alfa. Já Bray-Curtis e medidas de diversidade beta Unifrac ponderada indicaram diferenças significativas principalmente entre as mulheres pré-menopáusicas e os homens. Houve uma tendência de maior riqueza medida por Chao1 nas mulheres pré-menopáusicas e do que nas pós-menopáusicas e nos homens em indivíduos não obesos.

Em comparação com mulheres pré e pós-menopáusicas, os homens tinham maior abundância de várias espécies de *Prevotellaceae* (*Prevotella sp. CAG:520*, *Prevotella multisaccharivorax*, *Prevotella sp. AGR2160*, *Prevotella nanciensis*, *Prevotella sp. HMSC073D09*, *Prevotella bergensis*, *Prevotella sp. CAG:924*, *Prevotella ruminicola*) e *Clostridium sp. CAG:277*,

mas níveis mais baixos de *Roseburia sp. CAG:380*, *Firmicutes bacterium CAG:884*, *Lachnospiraceae bacterium CAG:364*, *Bacillus sp. CAG:988*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Clostridium sp. CAG:557*, *Bacteroides dorei CAG:222*, e *Lachnospiraceae bacterium CAG:215* (MAYNERIS-PERXACHS *et al.*, 2020).

Quando estudadas as doenças autoimunes dimórficas é possível afirmar que os fatores genéticos, os hormônios sexuais e o ambiente modulam o resultado da composição microbiana e do fenótipo da doença. Os hormônios sexuais podem modular o ambiente imunológico local. O impacto do estrogênio em várias células imunológicas contribui para um ambiente imunológico hiperativo, enquanto os androgênios (testosterona) mantêm um ambiente imunológico anti-inflamatório da mucosa (GOMEZ; LUCKEY; TANEJA, 2015).

Estas diferenças são vistas em outras doenças que possuem uma tendência relacionada ao dimorfismo sexual, como nas questões cardiovasculares (RAZAVI *et al.*, 2019), e em doenças relacionadas ao eixo intestino-cérebro, como SII, sensibilidade visceral (JASAREVIC *et al.*, 2015).

Em sua revisão, Jasarevic *et al.* (2015) trazem que em modelos de roedores, as comunidades microbianas nas fêmeas exibem alta variabilidade em relação aos machos, sugerindo uma contribuição de natureza pulsátil dos estrogênios para manutenção de um microbioma intestinal feminino variável. Foi associado aos períodos de declínio hormonal, aos episódios de exacerbação de sintomas gastrointestinais, risco de infecção, transtornos afetivos, como ansiedade e depressão. Por outro lado, em momentos de elevação hormonal, como na gestação, há relatos de alívio de sintomas.

Em nosso trabalho abordaremos apenas do ponto de vista das diferenças encontradas em nível de sexo feminino ou masculino, sem considerar valores hormonais, mas consideramos importante abordar, na revisão, o que já foi associado a este tema.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho faz parte de uma cooperação técnica entre o Laboratório de Polimorfismos Genéticos da Universidade Federal de Santa Catarina (LAPOGE/CCB/UFSC), o

Laboratório de Genômica (LAGEN/CCB/UFSC) e a empresa privada, Biogenetika, detentora dos dados.

Os participantes voluntários foram esclarecidos quanto à possibilidade de uso de seus dados para a pesquisa e assegurados do sigilo das informações pessoais e em anonimato, assinando na sequência o Termo de Consentimento Livre Esclarecido, elaborado e mantido pela Biogenetika. Apenas os dados dos pacientes que consentiram em participar de pesquisas científicas serão disponibilizados pela Biogenetika de forma anônima.

Este trabalho foi registrado na Plataforma Brasil (<https://plataformabrasil.saude.gov.br/login.jsf>) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (ANEXO A).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES

Os indivíduos participantes do estudo não foram padronizados, sendo que os mesmos procuraram a empresa parceira de forma voluntária para realizar seu teste de microbioma individual. Portanto, este estudo compreende indivíduos saudáveis ou com alguma condição de saúde específica autorreferida, coletada através de questionário pela empresa parceira.

Ao cadastro para a coleta das amostras foi enviado um questionário, padronizado pela empresa parceira, onde os participantes informaram os seguintes dados: idade, sexo, profissão, peso, altura, tipos de dieta (com recordatório de 24h), consumo ou não de bebidas alcoólicas, se possuem vícios, se fazem uso de medicamentos, se fazem uso de suplementos, se utilizam probióticos, se realizaram tratamento de quimioterapia, se praticam alguma atividade física e o tipo de nascimento (parto normal ou cesariana).

Analisamos os dados de 85 participantes anônimos, disponibilizados pela empresa parceira, que realizou previamente a coleta e processamento das amostras de fezes e o sequenciamento do metagenoma.

3.3 ESTRUTURA DO QUESTIONÁRIO

Descrição do questionário através de formulário eletrônico, enviado aos participantes desta pesquisa pela empresa parceira:

- Campo aberto para: nome, contatos pessoais, Estado da Federação, profissão, sexo (masculino/feminino), altura, peso, idade.

- Em seguida, está escrita a pergunta: “Você está realizando algum tipo de dieta atualmente ou tem algum cuidado especial na sua alimentação?” com um campo para seleção de uma das opções: vegetariana, vegana, low carb, hipocalórica, sem glúten, sem lactose, entre outros. Então há uma pergunta: “Qual dieta?” e um campo aberto para a resposta. A seguir há uma instrução: “Informe o recordatório alimentar de 1 dia (café da manhã, lanche, almoço, lanche e jantar)” e um campo aberto para resposta.

- Após, há a frase “Se você consome bebida alcoólica relate brevemente tipo e frequência” e um campo aberto para a resposta

- Então há a pergunta “Você tem algum vício (café, refrigerante, chocolate, cigarro, etc)?” e abre uma com as opções: sim ou não. A seguir vem a pergunta: “Qual vício?” com um campo aberto para a resposta.

- Em seguida, está descrita a pergunta: “Você faz uso de algum medicamento atualmente?” com apenas duas opções abaixo para serem selecionadas: sim ou não. Há a pergunta: “Qual medicamento?” e um campo aberto para a descrição da resposta.

- Após, há a pergunta: “Suplementos em uso atualmente (vitaminas, aminoácidos, fitoterápicos)” com duas opções abaixo para serem selecionadas: sim ou não.

- Então há a pergunta: “Probióticos em uso atualmente?” com duas opções abaixo para serem selecionadas: sim ou não.

- Em seguida, há o questionamento: “Você já fez uso de antibióticos, corticóides ou remédios para emagrecer nos últimos 3 meses?” com duas opções abaixo para serem selecionadas: sim ou não. Segue-se uma pergunta: “Qual?” com um campo aberto para a resposta.

- Após, a indagação: “Já passou por algum tipo de tratamento quimioterápico?” com duas opções de resposta abaixo: sim ou não. Então segue a pergunta: “Se sim, qual? Data?” com um campo aberto para a resposta.

- Então há a seguinte solicitação: “Assinale caso possua diagnóstico para as seguintes condições clínicas e especifique a data do diagnóstico na caixa de texto abaixo:” com diversas opções que possibilitam a seleção simultânea: “Doença de Crohn, Síndrome do Intestino Irritável, Doença Inflamatória Intestinal, Colite Ulcerativa, Dispepsia, Doença Celíaca, Intolerância a Lactose, Diabetes, Câncer, Depressão, Autismo, Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade,

Transtorno de ansiedade, Asma, Alergia, Artrite Reumatoide, Lúpus Eritematoso sistêmico e Osteoartrite”.

- Em seguida, está descrito: “Caso possua algum diagnóstico não especificado acima, por favor, descreva” com um campo aberto para a resposta.

- Após, há a seguinte solicitação: “Assinale abaixo caso possua algum dos sintomas descritos:” com diversas opções que possibilitam a seleção simultânea: “náusea, dor abdominal, distensão abdominal, diarreia, sensibilidade abdominal, flatulência, constipação, vômito”. Logo abaixo há a seguinte pergunta: “Os sintomas indicados iniciaram há quanto tempo?” com um campo aberto para a descrição.

- Então há a seguinte frase: “Caso possua algum outro sintoma que julgue importante relatar, especifique:” com um campo aberto para a resposta.

- Em seguida, está a pergunta: “Você pratica alguma atividade física com regularidade? Se sim, quantas horas semanais?” com 4 opções únicas de resposta: “sim, até 3 horas” ou “sim, até 6 horas” ou “sim, mais que 6 horas” ou “não pratico”. Logo há a pergunta: “Qual a modalidade?” com um campo aberto para a resposta.

- Para finalizar, há o questionamento: “Sua forma de nascimento:” com as opções: parto normal ou cesárea para escolha única.

3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A coleta de amostras fecais é o método utilizado por este projeto devido à sua conveniência para amostras de microbioma intestinal. Os estudos têm considerado esta prática como substituta aceitável para a microbiota intestinal distal, em parte devido à sua natureza de coleta não invasiva, embora alguns estudos tenham mostrado mudanças graduais na microbiota ao longo do cólon intestinal e nas fezes (CLAESSON *et al.*, 2017). Para amostras retiradas diretamente do cólon, as diferenças entre os indivíduos são maiores que as diferenças entre diferentes locais de amostragem em um mesmo indivíduo, como é característico de estudos de microbioma intestinal. Além disso, as fezes são representativas de diferenças interindividuais (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

3.4.1 Coleta das amostras de fezes

Todos os participantes assinaram concordância em participar de forma anônima de pesquisas científicas. Este termo, assim como o contato direto com os participantes, foi realizado pela empresa parceira. A coleta das amostras de fezes utilizadas neste estudo foi realizada no período de abril de 2018 até abril de 2020. Os participantes receberam um kit OMNIgene.GUT (Marca DNA Genotek), para coleta de fezes com as instruções de coleta (ANEXO B), e os mesmos realizaram os procedimentos individualmente. Foram coletadas cerca de 520 mg de fezes, que foram mantidas em temperaturas de 15 a 25 graus Celsius, por até 60 dias. Logo após a coleta, o material foi enviado ao laboratório parceiro para extração do DNA do microbioma.

3.4.2 Extração do DNA

Com o kit QIAamp PowerFecal Pro DNA (Marca QIAGEN) foi realizada a extração do DNA do microbioma pela empresa parceira, seguindo todo o protocolo do fornecedor.

A solução CD2 é armazenada entre 2–8 ° C. Todos os outros reagentes e componentes do kit são armazenados em temperatura ambiente (15–25 ° C). Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25 ° C).

O tubo PowerBead Pro é agitado brevemente para garantir que os grânulos se acomodam na parte inferior. Foi adicionado até 250mg de fezes e 800µl de solução CD1. Após, girado brevemente para misturar. O tubo PowerBead Pro foi horizontalmente preso em um adaptador Vortex para tubos de 1,5–2ml e, então, girado na velocidade máxima por 10 minutos. Em seguida foi centrifugado a 15.000 xg por 1 minuto.

O sobrenadante (cerca de 500–600µl) foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 2 ml limpo. Foi adicionado 200 µl de Solução CD2 e girado por 5 segundos. Então centrifugado a 15.000 xg por 1 minuto em temperatura ambiente.

Foi transferido até 700 µl de sobrenadante para um tubo de microcentrífuga de 2 ml limpo, e adicionado 600 µl de Solução CD3 e vortex por 5 segundos. Foi carregado 650µl do lisado em uma coluna MB Spin e centrifugado a 15.000 xg por 1 min. Em seguida descartado o fluxo e repetida a etapa 8 para garantir que todo o lizado tenha passado pela coluna de rotação MB.

Foi colocada cuidadosamente a coluna MB Spin em um tubo de coleta de 2 ml limpo.

Adicionada 500µl de Solução EA à coluna de rotação MB. Centrifugada a 15.000 xg por 1 min. Descartado o fluxo e colocada a coluna MB Spin de volta no mesmo tubo de coleta de 2 ml. Então adicionamos 500 µl de solução C5 à coluna de rotação MB, e centrifugada a 15.000 xg por 1 min.

Descartado o fluxo, é colocada a coluna de rotação MB em um novo tubo de coleta de 2 ml. Centrifugada a até 16.000 xg por 2 min. Colocada cuidadosamente a coluna de rotação MB em um novo tubo de eluição de 1,5 ml. Adicionada 50–100 µl de Solução C6 ao centro da membrana do filtro branco. Então centrifugada a 15.000 x g por 1 min. Descartada a coluna de rotação MB. O DNA agora está pronto para aplicações seguintes.

3.4.3 Preparo das amostras de DNA para leitura

Após a extração do DNA, as bibliotecas emparelhadas foram preparadas, usando 500 ng de DNA genômico, de acordo com as instruções do fabricante para o Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide (Illumina®) e NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (Illumina®). Foi realizado o sequenciamento do DNA obtido através da tecnologia Nex Seq 500 (Illumina).

As leituras foram enviadas para o laboratório parceiro da UFSC. Até a presente etapa não houve participação da UFSC.

3.5 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Os dados das sequências obtidas por sequenciamento de Whole Genome Sequencing Shotgun (WGS-shotgun) do microbioma intestinal de 85 indivíduos adultos, foram disponibilizados ao Laboratório de Genômica (LAGEN/CCB/UFSC) pela empresa parceira detentora dos dados. As leituras do metagenoma foram disponibilizadas e recebidas no formato fastq.gz.

Utilizamos o Metaphlan (Metagenomic Phylogenetic Analysis) para traçar traça o perfil de composição das comunidades microbianas (BEGHINI *et al.*, 2020). Para isso a ferramenta utiliza marcadores específicos de clado, cerca de ~ 1,1 milhões de genes marcadores específicos,

armazenados no banco de dados CHOCOPhlan. Ainda para realização das análises taxonômicas e funcionais usamos ferramentas do bioBakery3. BioBakery3 é uma coleção de diferentes ferramentas computacionais que permitem realizar controle de qualidade, análise taxonômica e funcional e identificação de cepas (BEGHINI *et al.*, 2020).

Realizamos a análise de diversidade alfa em nível de espécie, através do pacote “phyloseq” disponível no software R através da função estimate_richness. Para diversidade beta foi utilizada a função ordinate() do mesmo pacote, com os parâmetros method="PCoA", distance=dist_bray e distance=dist_bray distance=dist_js (McMURDIE; HOLMES, 2013). A partir de dados gerados pelo phyloseq foi utilizado o “microbiome R package” para calcular raridade (rare_abundance), uniformidade, dominância (LAHTI *et al.*, 2017).

3.6 ÍNDICES DE DIVERSIDADE ALFA

Para estimar a riqueza (S) utilizamos a abordagem não paramétrica de Chao1 (CHAO, 1984), que é definida pela seguinte fórmula:

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + n_1^2/2n_2$$

Onde S_{obs} é o número de espécies observadas, n_1 é o número de espécies capturadas apenas uma vez, e n_2 é o número de espécies capturadas duas vezes (HUGHES, 2001; CHAO, 1984).

Para combinar as medidas de riqueza e abundância utilizamos a diversidade de Shannon, a Diversidade de Simpson e a Dominância de Simpson. Para uma revisão sobre estes índices verificar o Apêndice 1.

Diversidade de Shannon (H) é representado pela fórmula:

$$-\sum P_i \ln(P_i)$$

Diversidade de Simpson (D1) é representado pela fórmula:

$$1/\sum P_i^2$$

Dominância de Simpson (D2) é representada pela fórmula:

$$1/\sum P_i^2$$

Outro importante ponto de observação da diversidade alfa é a uniformidade. Esta não é calculada de forma independente, mas sim derivada de medidas de diversidade compostas. Utilizamos a uniformidade de Simpson (E) calculada a partir de D2.

3.7 DIVERSIDADE BETA

As análises de beta-diversidade foram realizadas utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957). A distância de Bray-Curtis é definida como a diferença da abundância dividida pela abundância total contribuída por ambas as amostras (TANG *et al.*, 2016). A diversidade beta mede quão diferentes dois vetores de composição são em geral, em vez de em relação a um único táxon. Para “n” casos e “m” não casos, calcula-se a matriz simétrica $(n + m) \times (n + m)$ cujos elementos fora da diagonal são as dissimilaridades de pares entre as amostras do microbioma (GAIL; WAN; SHI, 2021).

Para ver se as dissimilaridades entre os grupos são significativamente maiores do que as dissimilaridades dentro dos grupos, uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) pode ser realizada (GAIL; WAN; SHI, 2021).

3.8 ÍNDICE DE SAÚDE DO MICROBIOMA INTESTINAL (GMHI)

Desenvolvido por Gupta *et al.* (2020), especificamente para estudos de microbioma intestinal humano, o Índice de Saúde do Microbioma Intestinal (GMHI, do inglês *Gut Microbiome Health Index*) é robusto para avaliar o estado de saúde (grau de presença/ausência de doença diagnosticada) com base no perfil taxonômico em nível de espécie, a partir de uma amostra de fezes processada por metagenoma de espingarda (Whole Genome.Shotgun).

O GMHI é uma fórmula matemática biologicamente interpretável para prever a probabilidade de doença, independentemente do diagnóstico clínico. Os valores do índice GMHI podem variar de -6 até 6, sendo que valores mais altos estão fortemente associados às amostras saudáveis utilizadas no estudo, e os valores menores associados às amostras de indivíduos com condições de ausência de saúde.

Utilizamos o script disponibilizado pelos autores do estudo original disponível em: https://github.com/jaeyunsung/GMHI_2020.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Para realizar os testes estatísticos utilizamos o software SPSS, o programa Microsoft Excel com o aditivo Real Statistics Resources (<https://www.real-statistics.com>) e os pacotes do R Program MaAsLin2 (MALLICK *et al.*, 2021) e vegan (OKSANEN *et al.*, 2020).

Para os Índices de diversidade alfa utilizados realizamos teste de Shapiro-Wilk ou d'Agostino-Pearson para verificar se os dados se distribuem de forma normal. Quando a resposta foi positiva, realizamos testes paramétricos de acordo com a quantidade de grupos existentes. Para 2 grupos realizamos Teste t, e quando mais grupos, teste de ANOVA. Quando os dados eram não paramétricos realizamos teste de Mann-Whitney para 2 grupos e teste de Kruskal-Wallis para mais de 2 grupos. Não foi necessário realizar o teste *post-hoc* de Tukey. Para considerarmos como significativas consideramos um valor de p menor que 0,05.

Utilizamos Índice Chao1 para Riqueza (S), e, para correlacionar a riqueza e uniformidade utilizamos o Índice de Shannon (H), a Dominância de Simpson (D2), a Uniformidade de Simpson (E) e abundância rara para Raridade. Para análises estatísticas de sexo utilizamos o Teste t com Intervalo de Confiança (IC) de 95% e $p < 0,05$ para S, H, D2 e E, assim como o Teste de Mann-Whitney com IC de 95% e $p < 0,05$ para Raridade. Para as análises estatísticas de idade foram utilizados o teste de ANOVA de uma via com IC de 95% e $p < 0,05$ para S, H, D2 e E, assim como o teste de Kruskal-Wallis com IC de 95% e $p < 0,05$ para abundância rara.

Avaliamos a diversidade beta (diversidade entre indivíduos) utilizando índice de dissimilaridade de Bray Curtis. Para determinarmos diferenças significativas entre os grupos e amostras do microbioma utilizamos PERMANOVA no Pacote para R vegan (OKSANEN *et al.*, 2020) com a função `adonis()`. Os gráficos também foram gerados por este pacote com a função `capture.output()` e `vegdist()`.

Para analisar a abundância relativa das espécies do microbioma amostrado utilizamos o pacote do R Program MaAsLin2 (MALLICK *et al.*, 2021) que realiza as análises estatísticas eliminando falsos positivos e falsos negativos, portanto maior rigor nas análises. MaAsLin é uma estrutura estatística multivariada que encontra associações entre metadados clínicos e abundância ou função da comunidade microbiana. Os metadados clínicos podem ser contínuos (idade e peso), booleano (sexo, fezes, biópsia) ou discreto/fator (agrupamentos de coorte e fenótipos). MaAsLin associa muitos metadados a medições microbianas. Quando for este o caso, cada metadado pode

ser de um tipo diferente. Por exemplo, pode ser incluída a idade, peso, sexo, coorte e fenótipo no mesmo arquivo de entrada a ser analisado na mesma execução do MaAsLin. Espera-se que as medições microbianas sejam normalizadas antes de usar MaAsLin e, portanto, os dados proporcionais variam de 0 a 1,0.

Os resultados de uma execução do MaAsLin são a associação de um membro específico da comunidade microbiana com metadados. Essas associações não são influenciadas pelos outros metadados do estudo. Existem certos fatores conhecidos que podem influenciar o microbioma (por exemplo, dieta, idade, geografia, origem da amostra fecal ou de biópsia). O MaAsLin permite detectar o efeito de um metadado, possivelmente, um fenótipo, desconfigurando os efeitos da dieta, idade, origem da amostra ou quaisquer outros metadados capturados no estudo. As associações são consideradas significativas se seu valor q for igual ou inferior a taxa máxima de descoberta falsa (limite de significância) que por default é de 0,25. Este valor foi mantido. Foram mantidos significativas as associações que obtiveram $p < 0,05$ e $q < 0,25$.

Foram utilizados os comandos `input_data = read.csv ()` e `input_metadata = read.csv ()` para inserir os dados provenientes do MetaPhlan e organizados em planilha do excel e convertidos para formato “.tsv”, assim como os metadados da amostra. Para cada variável analisada (IMC, idade e sexo) foram realizadas análises separadas através da função `Maalsin2 ()`. Com esta função já são gerados os resultados e gráficos finais. Esta análise foi realizada tanto em nível de gêneros quanto de espécies.

4 RESULTADOS

Realizamos as análises dos resultados das amostras obtidas de forma coletiva, representando, assim, o grupo de uma forma geral. Mas também pudemos dividir estes indivíduos, de acordo com os fatores apontados na literatura científica como relacionados com diferentes implicações do microbioma intestinal, como idade, sexo e IMC.

Em uma análise final, aproveitamos os dados contidos no questionário respondido autonomamente, por cada participante, à empresa parceira em relação a algum tipo de condição específica de saúde, como sintoma ou diagnóstico apenas para calcular o GMHI.

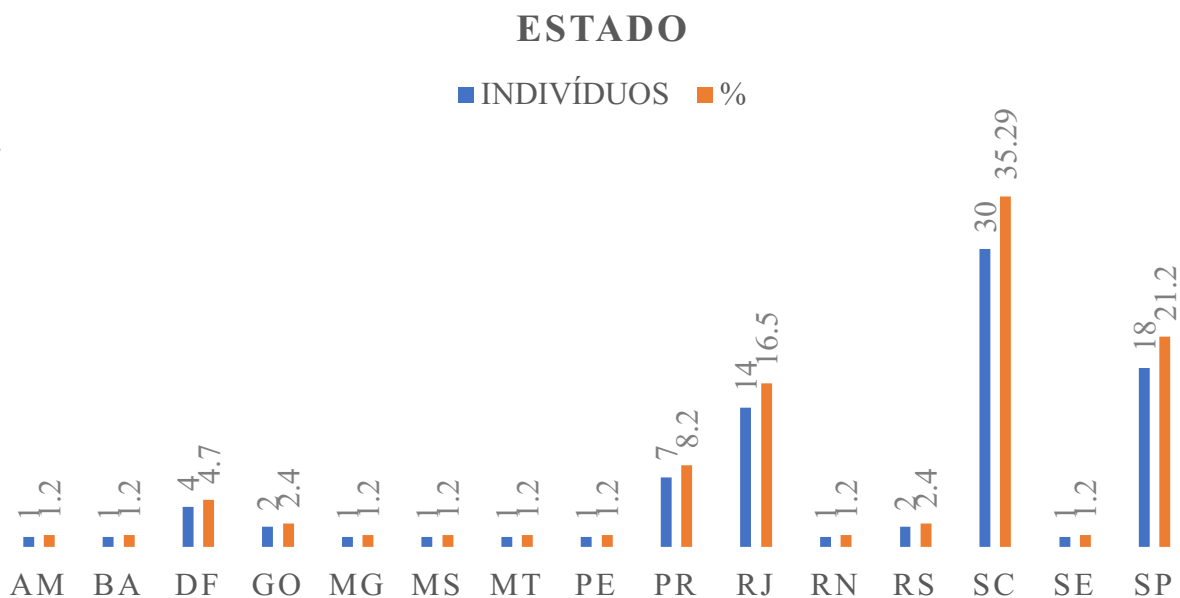
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os dados informados a seguir foram coletados a partir dos formulários respondidos por cada um dos participantes. Todos foram auto reportados, não havendo intervenção.

4.1.1 Distribuição por Estados

Participaram da pesquisa 85 indivíduos de 15 Estados da Federação, sendo mais representativo o Estado de Santa Catarina, com 30 indivíduos (35,3% do total amostrado), seguido por São Paulo, com 18 indivíduos (21,2%) e Rio de Janeiro, com 14 indivíduos (16,5%).

Gráfico 1 - Indivíduos participantes do estudo divididos conforme seus Estados de residência: Amazonas (AM), Bahia (BA), Distrito Federal (DF), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS), Mato Grosso (MT), Pernambuco (PE), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Norte (RN), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Sergipe (SE), São Paulo (SP).

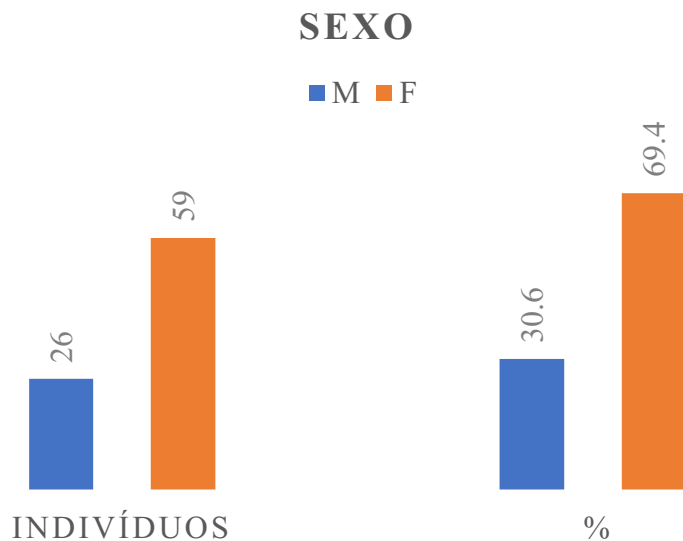


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.1.2 Distribuição por Sexo

Participaram do estudo 26 indivíduos do sexo masculino, representando 30,6% do total e 59 indivíduos do sexo feminino, representando 69,4%. Houve uma maior representatividade feminina no estudo.

Gráfico 2 – Indivíduos participantes do estudo divididos por sexo.

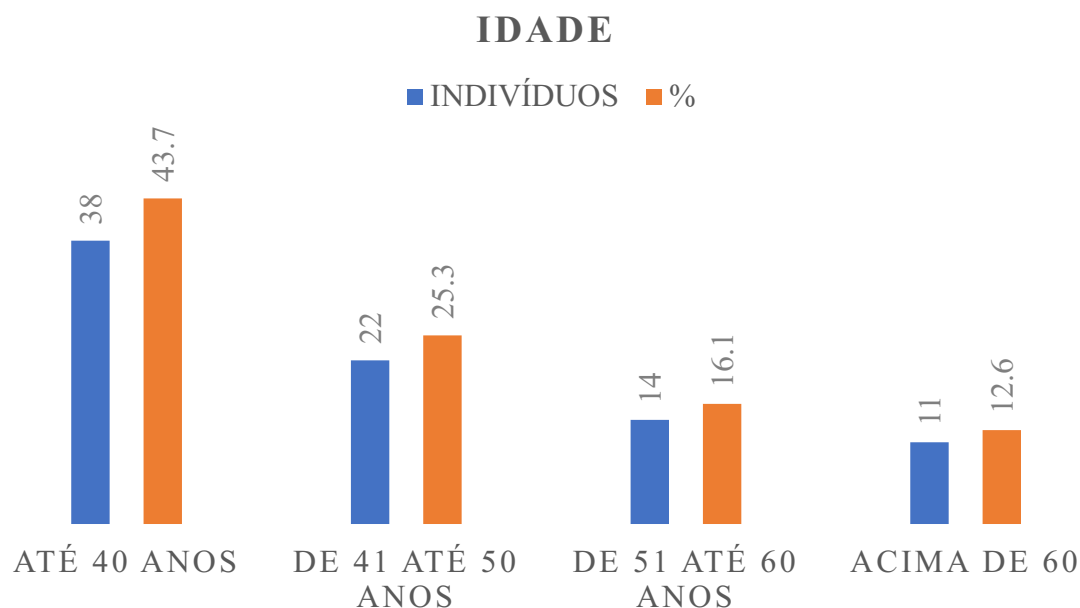


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.1.3 Distribuição por Idade

Quanto à idade, 38 indivíduos tinham até 40 anos (43,7%), 22 indivíduos até 50 anos (25,3%), 14 indivíduos até 60 anos (16,1%) e 11 indivíduos acima de 60 anos (12,6%).

Gráfico 3 – Distribuição dos participantes do estudo divididos de acordo com a idade.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.1.4 Índice de Massa Corporal (IMC)

Para a classificação do estado nutricional são adotados os conceitos de Índice de Massa Corporal (IMC), conforme os protocolos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995), e os Protocolos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) (BRASIL, 2008).

Calculamos o IMC com os valores de peso e altura informados pelos participantes. Os valores são obtidos através do cálculo do peso corporal, em quilogramas, dividido pela altura, em metros ao quadrado, conforme a fórmula:

$$\text{IMC} = \text{peso (kg)} / \text{altura} \times \text{altura (m}^2\text{)}$$

A interpretação para adultos, indivíduos acima de 20 anos e abaixo de 60 anos se dá conforme a tabela a seguir.

Quadro 1 – Distribuição dos pontos de corte do IMC e sua interpretação da classificação do estado nutricional de indivíduos adultos

Pontos de Corte do IMC	Classificação do estado nutricional
<18,5kg/m ²	Desnutrição
≥ 18,5 e < 25kg/m ²	Eutrofia
≥ 25 e < 30 kg/m ²	Sobrepeso
≥ 30 kg/m ²	Obesidade

Fonte: adaptado de WHO (1995).

Entretanto, a partir da idade de 60 anos completos a classificação do estado nutricional respeita a abordagem de Lipshitz (1994) e o protocolo do SISVAN (BRASIL, 2008), conforme apresentado na tabela a seguir.

Quadro 2 – Distribuição dos pontos de corte do IMC e sua interpretação da classificação do estado nutricional de indivíduos idosos

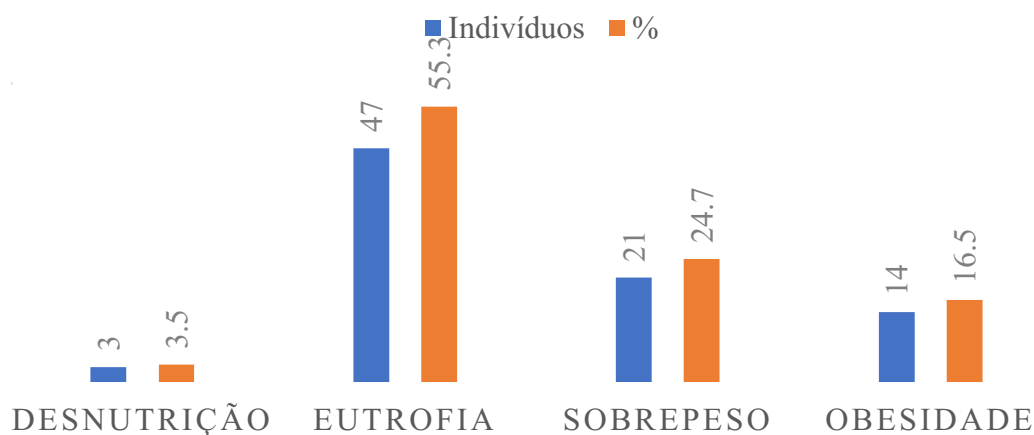
Pontos de Corte do IMC	Classificação do estado nutricional
<22kg/m ²	Desnutrição
≥ 22 e < 27kg/m ²	Eutrofia
≥ 27 kg/m ²	Sobrepeso
≥ 30 kg/m ²	Obesidade

Fonte: adaptado de Lipschitz (1994).

Nesta amostra, 47 indivíduos apresentavam-se na classificação de eutrofia, representando 55,3% do total da amostra, 3 indivíduos classificados em desnutrição, sendo 3,5% do total, 21 indivíduos apresentaram-se em sobrepeso, perfazendo 24,7% e 14 indivíduos foram classificados em obesidade, com 16,5% do total.

Gráfico 4 - Distribuição dos participantes do estudo divididos de acordo com a Classificação Nutricional relacionada com o IMC.

CLASSIFICAÇÃO NUTRICIONAL PELO IMC



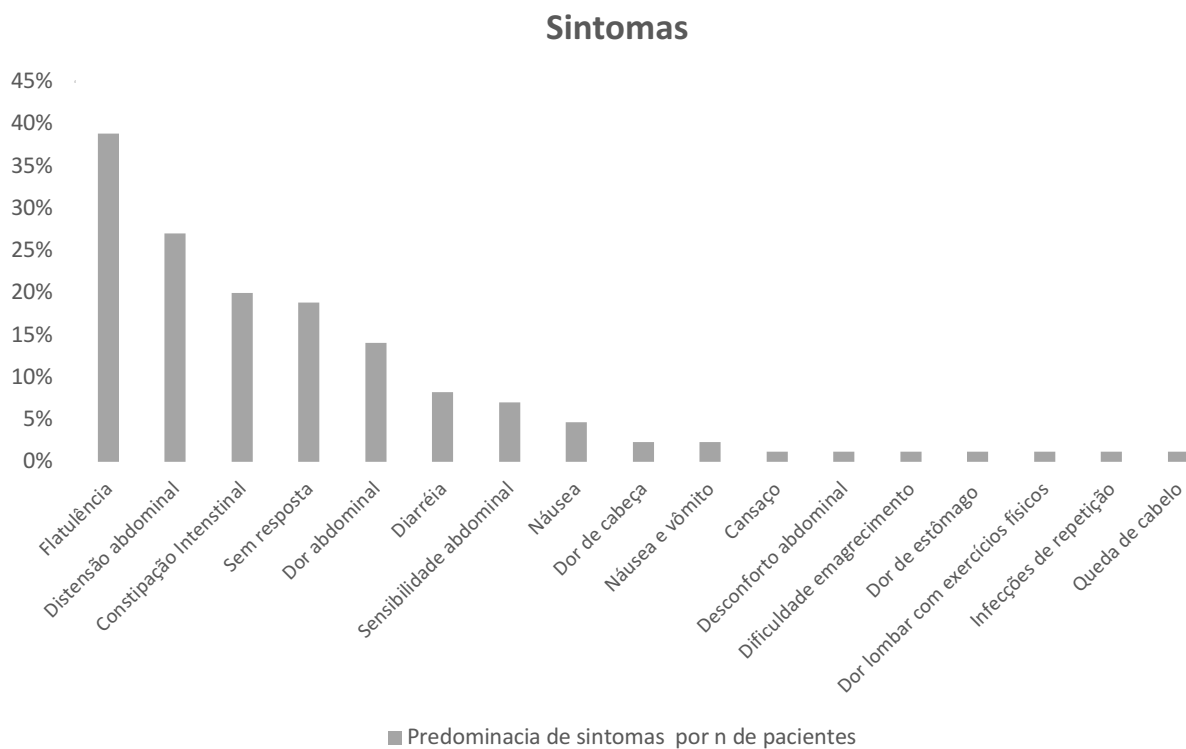
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.1.5 Controles x Casos

Dentre os indivíduos participantes do estudo, 6 foram os que não referiram nenhum sinal e sintoma ou diagnóstico, e se apresentaram na classificação de eutrofia nutricional de acordo com o IMC. Estes foram classificados como controles.

Os demais, 79 indivíduos, relataram algum dos sinais e sintomas ou diagnóstico referidos no questionário, ou ainda estavam classificados com sobrepeso ou obesidade pelo IMC calculado, conforme apresentado anteriormente. É importante salientar que um mesmo indivíduo pode possuir mais de um sintoma ou diagnóstico. Os dados dos sinais e sintomas são apresentados no gráfico 5.

Gráfico 5 - Distribuição dos participantes do estudo, conforme os sinais e sintomas, relatados de forma autônoma no questionário.

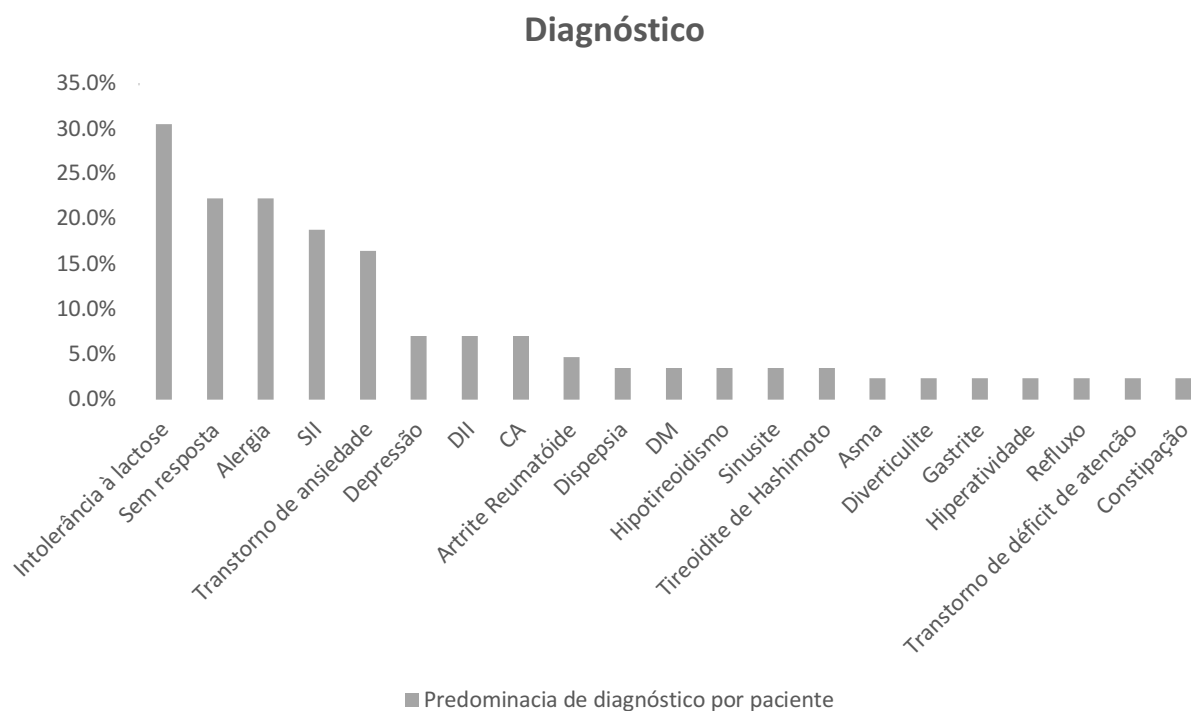


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Verificamos que 39% dos pacientes possuíam o sintoma de flatulência, seguido de 24% com distensão abdominal, 20% com constipação intestinal, 14% apresentaram dor abdominal, 8% com diarreia, 7% com sensibilidade abdominal, 5% com náuseas, 2% apresentaram dores de cabeça e náuseas com vômitos, e 1% apresentaram cansaço, desconforto abdominal, dificuldade de emagrecimento, dor de estômago, dor com exercícios, infecções de repetição e queda de cabelo, sendo que 19% dos entrevistados não responderam a esta questão (“sem resposta”) e foram classificados como sem sintomas.

Os dados dos diagnósticos, coletados conforme o questionário, encontram-se no gráfico 6.

Gráfico 6 - Distribuição dos participantes do estudo conforme os diagnósticos relatados de forma autônoma no questionário. SII – Síndrome do Intestino Irritável; DII – Doença Inflamatória Intestinal; DM – Diabetes Mellitus; CA - Câncer



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Identificamos que 30,6% dos entrevistados apresentavam diagnóstico de Intolerância à Lactose, 22,4% Alergia, 18,8% Síndrome do Intestino Irritável (SII), 16,5% Transtorno de ansiedade, 7,1% Depressão, Doença Inflamatória Intestinal (DII) e Câncer, 4,7% Artrite reumatoide, 3,5% apresentavam Dispepsia, Diabetes Mellitus (DM), Hipotireoidismo, Sinusite, Tireoidite de Hashimoto, 2,4% apresentaram Asma, Diverticulite, Gastrite, Hiperatividade, Refluxo, Transtorno de déficit de atenção e Constipação intestinal. Dentre os entrevistados, 22,4% não responderam ao questionamento de diagnóstico e foram classificados como sem diagnóstico.

4.2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

É importante dizer que as análises taxonômicas apresentadas por este trabalho se referem ao domínio Bactéria (WOESE *et al.*, 1990; ARCHIBALD, 2015), e que os demais encontrados foram eliminados das análises.

4.2.1 Abundância relativa de táxons nos diferentes níveis de classificação

Obtivemos como resultado, na análise de bioinformática no programa MetaPhlan, a abundância de *reads*, de todas as 85 amostras analisadas nos diferentes níveis taxonômicos. Para que os dados pudessem ser comparados, o sistema gerou automaticamente a abundância relativa das amostras obtendo um percentual de cada amostra, eliminando a variabilidade do número de *reads*. Após realizamos os processamentos no Programa R, conforme já descrito na metodologia.

Eliminamos as abundâncias referentes à identificação de *Eucariotos* e *Euryarchaeota* (Classe *Methanobacteria*). Os Eucariotos obtiveram a abundância relativa total de 0,014% e estiveram presentes em 5 amostras. O filo *Euryarchaeota*, que faz parte do domínio Archea, obteve uma abundância relativa total de 0,009% e estiveram presentes em 16 amostras.

Obtivemos como resultados pertencentes ao domínio bacteriano: 11 Filos, 21 Classes, 32 Ordens, 56 Famílias, 128 Gêneros e 357 Espécies até a ordem de 10^{-4} (0,1% da abundância) em pelo menos 1 indivíduo amostrado.

4.2.1.1 Filo

No gráfico 7, apresentamos a distribuição da abundância relativa média do coletivo das amostras no nível filogenético em 11 filios.

Tabela 1 – Distribuição percentual da abundância relativa em nível de Filo do domínio Bacteria, encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros.

Filos	% de abundância relativa geral	% de prevalência
Bacteroidetes	65,11	100
Firmicutes	29	100
Proteobacteria	2,71	100
Actinobacteria	1,72	98,8
Verrucomicrobia	1,35	58,8
Lentisphaerae	0,043	35,3
Synergistetes	0,0073	25,88
Fusobacteria	0,007	1,17
Spirochaetes	0,004	1,17
Candidatus Melainabacteria	0,0022	3,52
Cyanobacteria	0,000011	1,17

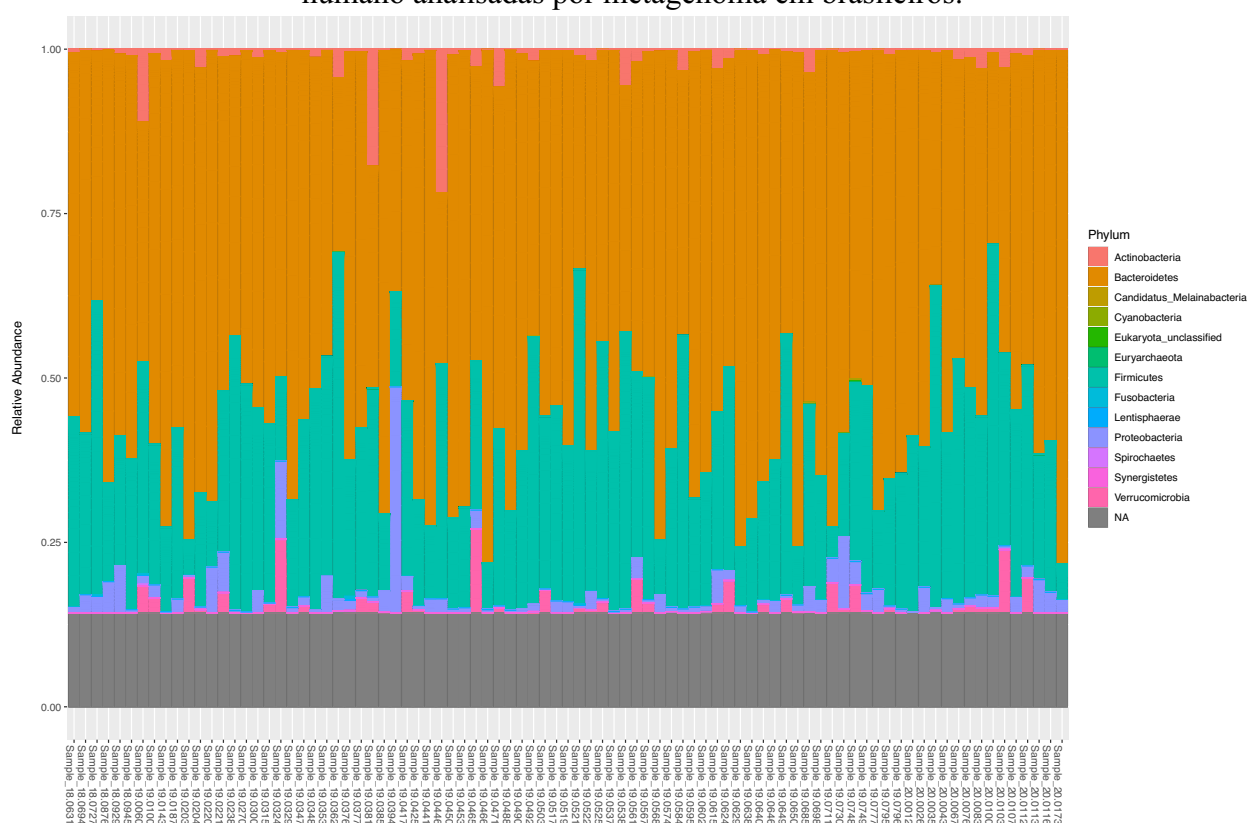
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A distribuição dos filos em cada amostra está representada na Figura 11.

Apesar da distribuição uniforme do coletivo, as variações individuais foram grandes, como em trabalhos anteriores (CLAESSON et al., 2010). Os Bacteroidetes variaram de 91,15% a 30,93%; os Firmicutes de 62,4% a 6,33%; as Proteobacterias de 40,08% a 0,12%; as Actinobacterias de 25,52% a 0% e o Verrucomicrobia de 13% a 0%, como pode ser verificado na Figura 11.

O filo dos Bacteroidetes foi representado principalmente pelos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, seguido por *Alistipes* e *Parabacteroides* em termos de número de espécies e abundância relativa. O filo dos Firmicutes foi representado em maior abundância pelo gênero *Faecalibacterium*, cuja única espécie encontrada foi *Faecalibacterium prausnitzii*, seguida pelos gêneros *Roseburia*, *Eubacterium* e *Ruminococcus*.

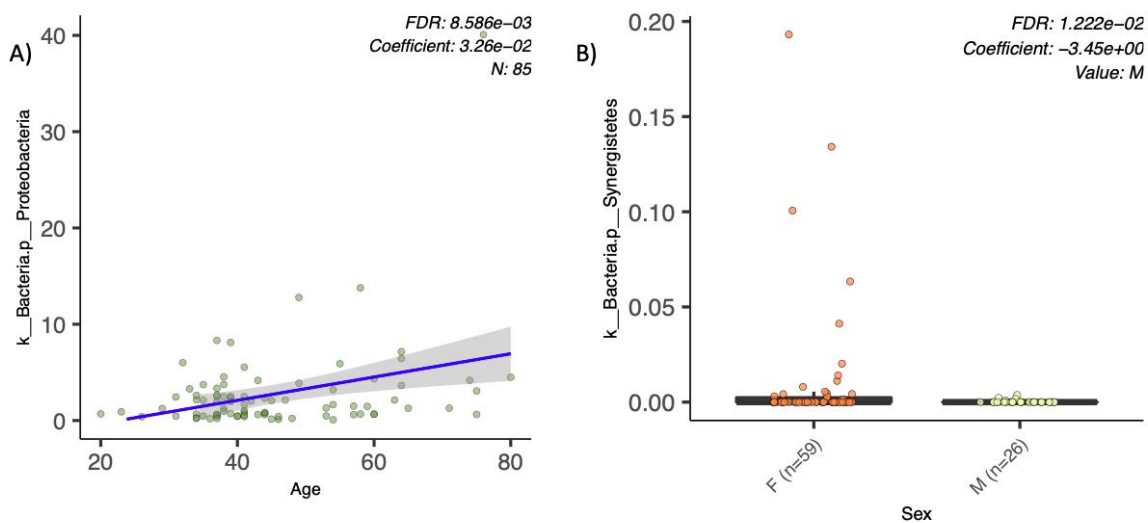
Figura 11 - Distribuição da abundância relativa por filos e por amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Verificamos os fatores intrínsecos do hospedeiro, como idade, IMC e sexo. Houve diferença estatística em nível de Filo relacionado com a idade e com o sexo, como pode ser verificado no gráfico 8, mas não com IMC.

Gráfico 7 - Distribuição comparativa da abundância relativa dos filós que apresentaram diferença significativa em relação a idade e sexo na população analisada (n=85). A) Gráfico representando a abundância relativa do Filo *Proteobacteria* em relação ao avanço da idade. B) Gráfico comparativo entre as abundâncias do Filo *Synergistetes* em relação ao sexo feminino e masculino.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Relacionamos de forma direta a abundância relativa do Filo Proteobacteria com a elevação da idade ($p = 0,001$; $q = 0,0085$). Entre as mulheres com mais de 60 anos a abundância relativa deste filo atingiu 8,9% e entre ambos os sexos acima de 60 anos, 6,15%. Quando analisamos a abundância relativa das Proteobacterias em relação aos diagnósticos ou sintomas referidos, verificamos que nos controles a abundância foi de 2,1%, já nos casos de flatulência de 4,6% e dor abdominal de 5,2%.

Também relacionamos maior abundância relativa do Filo Synergistetes em mulheres do que em homens ($p = 0,0017$; $q = 0,012$).

A relação entre os filós dos Firmicutes e Bacteroidetes (F/B) na amostra geral, avaliada por este trabalho, foi de 0,44. Quando esta relação F/B foi realizada para o grupo controle (sem

sintomas ou diagnósticos) (n = 6) encontramos a relação de 0,498, mostrando uma proporção de 2 Bacteroidetes para cada Firmicutes (F/B = ½).

4.2.1.2 Classe

Identificamos 21 classes diferentes na amostra de microbioma intestinal analisada, que são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição percentual da abundância relativa em nível de Classe do domínio Bacteria, encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros

Classes	% de abundância relativa
Bacteroidia	65,11
Clostridia	26,48
Negativicutes	1,64
Verrucomicrobiae	1,36
Gammaproteobacteria	1,32
Coriobacteria	0,91
Actinobacteria	0,81
Firmicutes	0,63
Betaproteobacteria	0,59
Proteobacteria não classificados	0,43
Deltaproteobacteria	0,35
Erysipelotrichia	0,15
Somatório das outras Classes	0,16

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.2.1.3 Ordem

Identificamos 32 ordens diferentes em nossa amostra de microbioma intestinal coletiva de indivíduos brasileiros, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição percentual da abundância relativa em nível de Ordem do domínio Bacteria, encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros

Ordem	% de abundância relativa
Bacteroidales	65,11
Clostridiales	26,48
Verrucomicrobiales	1,36

Enterobacteriales	1,27
Acidaminococcales	1,18
Bifidobacteriales	0,80
Coriobacteriales	0,75
Firmicutes não classificados	0,63
Burkholderiales	0,59
Veillonellales	0,45
Proteobacterial não classificados	0,43
Dessulfovibionales	0,35
Eggerthellales	0,16
Erysipelotrichales	0,15
Somatório das outras Ordens	0,217

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.2.1.4 Família

Identificamos 56 famílias diferentes em nossa amostra coletiva, apresentadas na Tabela

4.

Tabela 4 - Distribuição percentual da abundância relativa em nível de Família do domínio Bacteria, encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros

Família	% de abundância relativa
Bacteroidaceae	34,74
Prevotellaceae	17
Ruminococcaceae	10,44
Lachnospiraceae	9,25
Rikenellaceae	7,53
Tannerellaceae	3,71
Eubacteriaceae	3,47
Oscillospiraceae	1,63
Clostridiaceae	1,36
Akkermansiaceae	1,36
Enterobacteriaceae	1,27
Acidaminococcaceae	1,18
Barnesiellaceae	1,15
Odoribacteriaceae	0,9
Bifidobacteriaceae	0,8
Coriobacteriaceae	0,75
Firmicutes não classificada	0,63
Sutterellaceae	0,53
Veillonellaceae	0,45
Proteobacterias não classificadas	0,43

Desulfovibrionaceae	0,35
Clostridiales não classificados	0,32
Eggerthellaceae	0,16
Erysipelotrichaceae	0,15
Somatório das outras Famílias	0,3

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.2.1.5 Gênero

Nas 85 amostras analisadas, identificamos 128 gêneros de bactérias, apresentados na Tabela 5 até a abundância de 0,1%.

Tabela 5 – Distribuição percentual da abundância relativa e prevalência encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros em nível de Gênero do domínio Bacteria.

Gêneros	% de abundância relativa	Prevalência (%)
<i>Bacteroides</i>	34,75	100
<i>Prevotella</i>	16,68	64,7
<i>Alistipes</i>	7,54	91,76
<i>Faecalibacterium</i>	5,87	97,65
<i>Parabacteroides</i>	3,7	95,3
<i>Roseburia</i>	3,5	98,8
<i>Eubacterium</i>	3,46	98,8
<i>Ruminococcus</i>	2,14	93
<i>Lachnospiraceae</i>	1,87	80
<i>Oscillibacter</i>	1,63	87
<i>Ruminococcaceae</i>	1,41	73
<i>Akkermansia</i>	1,35	58,8
<i>Clostridium</i>	1,33	84,7
<i>Barnesiella</i>	1,12	57,6
<i>Escherichia</i>	0,97	69,4
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,92	89,4
<i>Bifidobacterium</i>	0,8	61,2
<i>Collinsella</i>	0,73	87
<i>Odoribacter</i>	0,68	86
<i>Lachnospira</i>	0,66	57,6
<i>Butyviribrio</i>	0,65	22,3
<i>Firmicutes</i> não classificados	0,63	84,7
<i>Fusicatenibacter</i>	0,61	95,3
<i>Blautia</i>	0,57	98,8
<i>Coprococcus</i>	0,53	91,8
<i>Proteobacteria</i> não classificados	0,43	50,6
<i>Dialister</i>	0,41	22,3

<i>Dorea</i>	0,4	96,5
<i>Parasutterella</i>	0,39	62,3
<i>Paraprevotella</i>	0,36	47
<i>Flavorifractor</i>	0,32	85,9
<i>Ruthenbacterium</i>	0,31	91,8
<i>Klebsiella</i>	0,26	35,3
<i>Acidaminococcus</i>	0,25	23,5
<i>Agathobaculum</i>	0,22	89,4
<i>Butyricimonas</i>	0,21	78,8
<i>Desulfovibrio</i>	0,21	32,9
<i>Anaerostipes</i>	0,2	77,6
<i>Lachnoclostridium</i>	0,15	55,3
<i>Intestimonas</i>	0,11	57,6
Outros 88 gêneros somados	1,54	-

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.2.1.5.1 Abundância dos Gêneros por sexo

Comparamos o percentual de abundância relativa entre os sexos feminino e masculino através do Pacote MaAsLin para o Programa R com o valor de $p < 0,05$ e $q < 0,25$. As associações significativas aumentadas para o sexo feminino em relação ao masculino são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa apresentou-se aumentada de forma significativa no sexo feminino quando comparado com o masculino.

Gêneros	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Bacteroides</i>	0.0006	0,031	100
<i>Alistipes</i>	0,0009	0,031	91,8
<i>Eggerthella</i>	0,0035	0,042	17,6
<i>Oxalobacter</i>	0,0036	0,042	22,3
<i>Adlercreutzia</i>	0,0045	0,045	47
<i>Asaccharobacter</i>	0,009	0,062	48,2
<i>Gordonibacter</i>	0,009	0,062	32,9
<i>Hungatella</i>	0,013	0,076	25,9
<i>Lachnoclostridium</i>	0,013	0,076	55,3
<i>Anaeromassilibacillus</i>	0,018	0,087	27
<i>Ruthenibacterium</i>	0,02	0,089	91,76
<i>Eisenbergiella</i>	0,026	0,11	34,1
<i>Intestimonas</i>	0,04	0,14	57,6

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

As associações significativas aumentadas para o sexo masculino em relação ao feminino são apresentadas na Tabela 7.

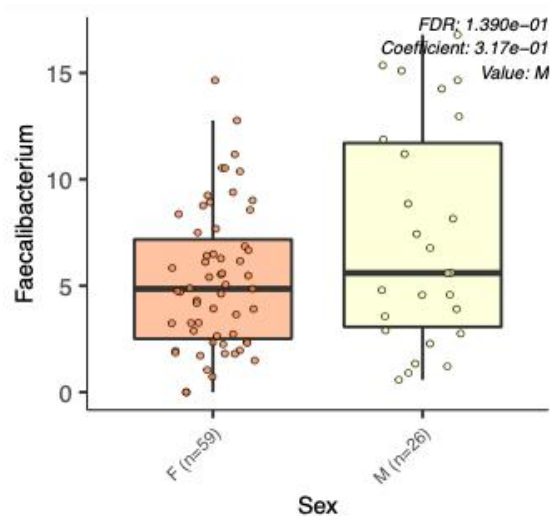
Tabela 7 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa apresentou-se aumentada de forma significativa no sexo masculino quando comparada com o feminino.

Gêneros	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,0012	0,03	89,4
<i>Veillonella</i>	0,0017	0,035	29,4
<i>Prevotella</i>	0,0023	0,04	64,7
<i>Anaerotruncus</i>	0,006	0,05	32,9
<i>Enterorhabdus</i>	0,009	0,06	17,6
<i>Holdemanella</i>	0,018	0,09	24,7
<i>Turicimonas</i>	0,018	0,09	54,1
<i>Faecalibacterium</i>	0,036	0,14	97,6
<i>Desulfovibrionaceae</i> não classificado	0,035	0,14	15,3

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O gênero *Faecalibacterium* apresentou prevalência de 97,65% nas amostras e, com os testes estatísticos realizados, atingiu diferença significativa em favor do sexo masculino com relação ao feminino, como pode ser visto no gráfico 8, sendo uma associação forte na amostra populacional analisada.

Gráfico 8 - Distribuição comparativa da abundância relativa entre o sexo feminino e masculino, com diferença significativa demonstrando maior abundância no sexo masculino para o gênero *Faecalibacterium*.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nos demais gêneros não houve diferença significativa entre os sexos.

4.2.1.5.2 Abundâncias dos Gêneros por Idade

Quando a abundância relativa das amostras foi relacionada com a variável ‘idade’, identificamos que alguns gêneros reduziram ou elevaram sua abundância com o avançar da idade. Os resultados representam os gêneros bacterianos cujas diferenças foram estatisticamente significativas através do Pacote MaAsLin para o Programa R com o valor de $p < 0,05$ e $q < 0,25$.

Tabela 8 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa reduziu de forma significativa com o avançar da idade.

Gêneros	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Harryflintia</i>	0,004	0,15	11,8
<i>Blautia</i>	0,006	0,15	98,8
<i>Eubacterium</i>	0,017	0,17	98,8
<i>Dorea</i>	0,015	0,17	96,5
<i>Fusicatenibacter</i>	0,017	0,17	95,3
<i>Pseudoflavonifractor</i>	0,016	0,17	10,6
<i>Coprococcus</i>	0,03	0,24	91,8

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os gêneros que verificaram redução da abundância com o avançar da idade e eram altamente prevalentes na amostra analisada, foram *Blautia*, *Eubacterium*, *Dorea*, *Fusicatenibacter* e *Coprococcus*.

Tabela 9 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa elevou de forma significativa com o avançar da idade.

Gêneros	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Paraprevotella</i>	0,003	0,15	47
<i>Enorma</i>	0,02	0,17	48,2
<i>Citrobacter</i>	0,01	0,17	15,3

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nos demais gêneros não houve diferença significativa relacionada com a idade.

4.2.1.5.3 Abundâncias dos Gêneros de acordo com o IMC

Quando a abundância relativa das amostras foi relacionada com a variável ‘IMC’, identificamos que alguns gêneros reduziram ou elevaram sua abundância com o elevar mesmo. Os resultados representam os gêneros bacterianos cujas diferenças foram estatisticamente significativas através do Pacote MaAsLin para o Programa R com o valor de $p < 0,05$ e $q < 0,25$.

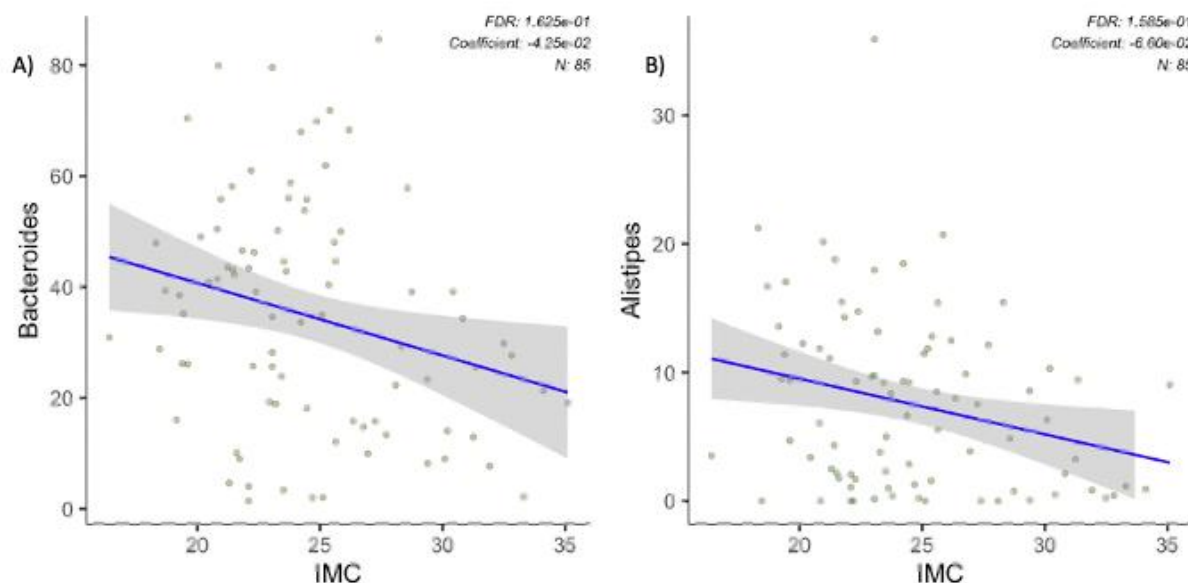
Tabela 10 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa reduziu de forma significativa com o elevar do IMC.

Gêneros	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Alistipes</i>	0,008	0,16	91,8
<i>Bacteroides</i>	0,01	0,16	100
<i>Coprobacter</i>	0,01	0,16	28,2
<i>Bifidobacterium</i>	0,02	0,20	61,2
<i>Agathobaculum</i>	0,03	0,22	89,4

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Relacionamos a abundância relativa das amostras com a variável IMC corporal, foi possível identificar alguns gêneros de alta prevalência, que se relacionaram de forma inversa e reduziram com a elevação do IMC, como *Bacteroides* e *Alistipes*, como apresentado no gráfico 9.

Gráfico 9 - Distribuição comparativa da abundância relativa dos gêneros que apresentaram redução da abundância com a elevação do IMC, e altamente prevalentes na amostra analisada. A) *Bacteroides* e B) *Alistipes*.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Já alguns gêneros revelaram uma relação direta com a elevação do IMC, como demonstrado na tabela 11.

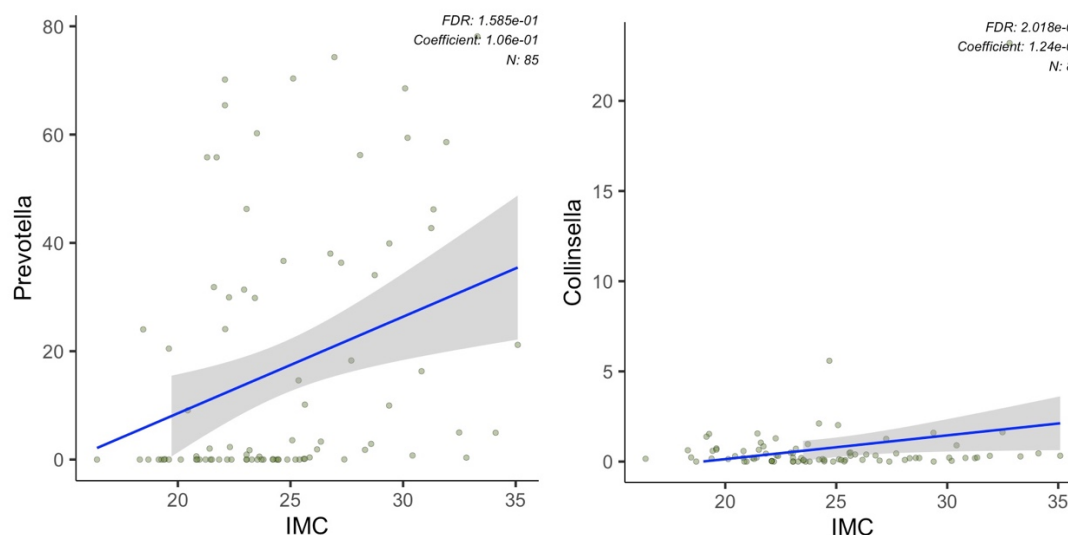
Tabela 11 – Gêneros bacterianos cuja abundância relativa aumentou de forma significativa com o elevar do IMC.

Gêneros	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Anaerotignum</i>	0,001	0,11	16,5
<i>Prevotella</i>	0,007	0,16	64,7
<i>Acidaminococcus</i>	0,006	0,16	23,5
<i>Collinsella</i>	0,02	0,20	87
<i>Harryflintia</i>	0,021	0,20	11,8

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Apresentamos os gráficos dos gêneros *Prevotella* e *Collinsella*.

Gráfico 10 - Distribuição comparativa da abundância relativa dos gêneros *Prevotella* e *Collinsella* que apresentaram aumento da abundância com a elevação do IMC na amostra analisada.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nos demais gêneros não houve diferença significativa associada ao IMC.

Algumas relações entre os gêneros são propostas na literatura científica, como é o caso da relação entre a abundância entre *Bacteroides* e *Prevotella*.

4.2.1.6 Espécies

Nas 85 amostras de microbioma intestinal humano de brasileiros, analisadas, foi possível identificar 357 espécies. A tabela 12 demonstra as abundâncias das 90 espécies com média de abundância relativa maior que 0,1% e prevalência acima de 90% das amostras, como no trabalho de Gupta *et al.* (2020).

Tabela 12 – Distribuição percentual da abundância relativa e prevalência encontrados em 85 amostras de microbioma intestinal humano analisadas por metagenoma em brasileiros em nível de Espécies do domínio Bacteria até a abundância relativa de 0,1%.

Espécies	% de abundância relativa	Prevalência (%)
<i>Prevotella copri</i>	13,8	50,6
<i>Bacteroides uniformis</i>	10,1	95,3
<i>Bacteroides vulgatus</i>	7,0	91,8
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	5,9	97,6
<i>Alistipes putredinis</i>	5,7	76,5
<i>Bacteroides dorei</i>	4,3	70,6
<i>Bacteroides stercoris</i>	3,5	65,9
<i>Parabacteroides distasoni</i>	2,2	94,1
<i>Eubacterium sp CAG180</i>	2,0	28,2
<i>Eubacterium rectale</i>	1,9	80,0
<i>Bacteroides fragilis</i>	1,7	38,8
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1,5	90,6
<i>Akkermansia muciniphila</i>	1,4	58,8
<i>Parabacteroides merdae</i>	1,3	76,5
<i>Eubacterium siraeum</i>	1,3	48,2
<i>Roseburia faecis</i>	1,3	85,9
<i>Oscillibacter sp 57 20</i>	1,2	76,5
<i>Barnesiella intestinihominis</i>	1,1	57,6
<i>Alistipes finegoldii</i>	1,1	80,0
<i>Escherichia coli</i>	1,0	69,4
<i>Eubacterium eligens</i>	0,8	88,2
<i>Ruminococcus bromii</i>	0,8	65,9
<i>Roseburia inulinivorans</i>	0,8	89,4
<i>Bacteroides caccae</i>	0,8	63,5
<i>Bacteroides massiliensis</i>	0,7	62,4
<i>Roseburia hominis</i>	0,7	84,7
<i>Bacteroides ovatus</i>	0,7	83,5
<i>Prevotella stercorea</i>	0,7	15,3
<i>Prevotella sp CAG 520</i>	0,7	9,4
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	0,7	50,6
<i>Collinsella aerofaciens</i>	0,7	84,7
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	0,7	85,9

<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	0,7	57,6
<i>Fusicatenibacter saccharivorans</i>	0,6	95,3
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	0,6	25,9
<i>Bacteroides eggerthii</i>	0,6	32,9
<i>Butyrivibrio crossotus</i>	0,6	14,1
<i>Roseburia intestinalis</i>	0,6	77,6
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0,6	35,3
<i>Ruminococcus bicirculans</i>	0,5	56,5
<i>Prevotella sp 885</i>	0,5	5,9
<i>Prevotella sp CAG 279</i>	0,5	25,9
<i>Alistipes shahii</i>	0,5	83,5
<i>Oscillibacter sp CAG 241</i>	0,4	74,1
<i>Bacteroides intestinalis</i>	0,4	32,9
<i>Proteobacteria bacterium CAG 139</i>	0,4	50,6
<i>Bacteroides faecis</i>	0,4	29,4
<i>Dialister sp CAG 357</i>	0,4	15,3
<i>Ruminococcus lactaris</i>	0,4	62,4
<i>Parasutterella excrementihominis</i>	0,4	62,4
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	0,3	80,0
<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	0,3	47,1
<i>Bacteroides finegoldii</i>	0,3	50,6
<i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>	0,3	91,8
<i>Flavonifractor plautii</i>	0,3	83,5
<i>Clostridium sp CAG 510</i>	0,3	7,1
<i>Clostridium sp CAG 58</i>	0,3	69,4
<i>Dorea longicatena</i>	0,3	89,4
<i>Bacteroides plebeius</i>	0,3	10,6
<i>Ruminococcus champanellensis</i>	0,3	7,1
<i>Eubacterium sp CAG 38</i>	0,3	61,2
<i>Bacteroides clarus</i>	0,3	22,4
<i>Clostridium sp CAG 632</i>	0,3	3,5
<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	0,3	60,0
<i>Coprococcus eutactus</i>	0,3	35,3
<i>Ruminococcus torques</i>	0,3	78,8
<i>Acidaminococcus intestini</i>	0,2	21,2
<i>Firmicutes bacterium CAG 110</i>	0,2	40,0
<i>Agathobaculum butyriciproducens</i>	0,2	89,4
<i>Coprococcus comes</i>	0,2	83,5
<i>Bacteroides faecis CAG 32</i>	0,2	15,3
<i>Desulfovibrio piger</i>	0,2	21,2
<i>Anaerostipes hadrus</i>	0,2	77,6
<i>Bacteroides salyersiae</i>	0,2	28,2
<i>Butyricimonas virosa</i>	0,2	77,6
<i>Eubacterium sp CAG 251</i>	0,2	30,6
<i>Alistipes inops</i>	0,2	12,9

<i>Prevotella sp</i> CAG 1092	0,2	5,9
<i>Firmicutes bacterium</i> CAG 83	0,2	50,6
<i>Bacteroides sp</i> CAG 927	0,2	3,5
<i>Alistipes indistinctus</i>	0,1	62,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,1	30,6
<i>Prevotella sp</i> AM42 24	0,1	10,6
<i>Blautia obeum</i>	0,1	80,0
<i>Firmicutes bacterium</i> CAG 170	0,1	32,9
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,1	38,8
<i>Clostridium sp</i> CAG 413	0,1	7,1
<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	0,1	57,6
<i>Blautia wexlerae</i>	0,1	75,3
<i>Ruminococcus sp</i> CAG 488	0,1	14,1

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.2.1.6.1 Abundância de Espécies de acordo com o Sexo

Comparamos o percentual de abundância relativa entre os sexos feminino e masculino através do Pacote MaAsLin para o Programa R com o valor de $p < 0,05$ e $q < 0,25$. As associações significativas aumentadas para o sexo feminino em relação ao masculino são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Espécies bacterianas cujas abundâncias relativas apresentaram-se aumentadas de forma significativa no sexo feminino quando comparado com o masculino.

Espécies	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0,001	0,05	90,6
<i>Alistipes inops</i>	0,002	0,06	12,9
<i>Eggerthella lenta</i>	0,003	0,07	17,6
<i>Alistipes putredinis</i>	0,004	0,07	76,5
<i>Oxalobacter formigenes</i>	0,004	0,07	22,4
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	0,004	0,08	47,1
<i>Clostridium asparagiforme</i>	0,005	0,08	23,5
<i>Ruminococcus bromii</i>	0,006	0,09	65,9
<i>Asaccharobacter celatus</i>	0,009	0,10	48,2
<i>Gordonibacter pamelaiae</i>	0,009	0,10	32,9
<i>Bacteroides salyersiae</i>	0,009	0,10	28,2
<i>Alistipes finegoldii</i>	0,010	0,10	80,0
<i>Ruminococcaceae bacterium</i> D16	0,010	0,10	21,2
<i>Dorea sp</i> CAG 317	0,012	0,11	12,9
<i>Bacteroides uniformis</i>	0,013	0,11	95,3
<i>Hungatella hathewayi</i>	0,013	0,11	25,9
<i>Bacteroides intestinalis</i>	0,015	0,12	32,9

<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	0,016	0,12	62,4
<i>Bacteroides dorei</i>	0,020	0,13	70,6
<i>Eisenbergiella tayi</i>	0,020	0,13	16,5
<i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>	0,020	0,13	91,8
<i>Turicimonas muris</i>	0,019	0,13	54,1
<i>Roseburia sp</i> CAG 471	0,025	0,16	27,1
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,028	0,17	38,8
<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	0,040	0,21	57,6
<i>Eubacterium sp</i> CAG 38	0,039	0,21	61,2
<i>Blautia obeum</i>	0,040	0,21	80,0
<i>Ruminococcaceae bacterium</i> D5	0,043	0,22	31,8
<i>Clostridium sp</i> CAG 242	0,047	0,23	20,0

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Encontramos, ainda, outras espécies de bactérias em maior abundância no sexo masculino do que no sexo feminino, como apresentamos na Tabela 14.

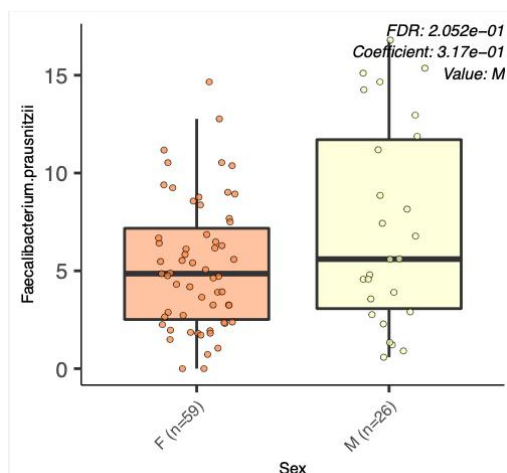
Tabela 14 – Espécies bacterianas cujas abundâncias relativas apresentaram-se aumentadas de forma significativa no sexo masculino quando comparado com o feminino.

Espécies	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Veillonella atypica</i>	0,00003	0,00	14,1
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	0,001	0,05	25,9
<i>Butyrivibrio sp</i> CAG 318	0,002	0,06	12,9
<i>Prevotella copri</i>	0,004	0,07	50,6
<i>Enterorhabdus caecimuris</i>	0,009	0,10	17,6
<i>Holdemanella biformis</i>	0,019	0,13	24,7
<i>Desulfovibrionaceae bacterium</i>	0,035	0,20	15,3
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,036	0,21	97,6

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A única espécie prevalente, relacionada ao sexo masculino, foi *Faecalibacterium prausnitzii*, como pode ser visto no gráfico 26.

Gráfico 11 - Distribuição comparativa da abundância relativa entre o sexo feminino e masculino, com diferença significativa, demonstrando maior abundância no sexo masculino na espécie *Faecalibacterium prausnitzii*.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nas demais espécies não houve diferença significativa entre os sexos.

4.2.1.6.2 Abundância de Espécies de acordo com a Idade

Quando relacionamos a abundância relativa das amostras com a variável 'idade', foi possível identificar que algumas espécies elevaram ou reduziram sua abundância com o avançar da idade. Os resultados representam as espécies bacterianas cujas diferenças foram estatisticamente significativas através do Pacote MaAsLin para o Programa R com o valor de $p < 0,05$ e $q < 0,25$.

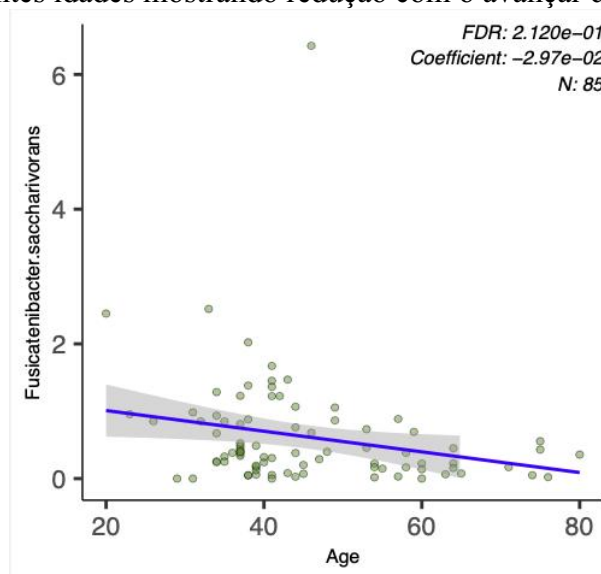
Tabela 15 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa reduziu de forma significativa com o avançar da idade.

Espécies	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Roseburia faecis</i>	0,0007	0,032	85,9
<i>Ruminococcus torques</i>	0,0012	0,036	78,8
<i>Dorea sp CAG 317</i>	0,0011	0,036	12,9
<i>Harryflintia acetispora</i>	0,0037	0,083	11,8
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,0043	0,086	38,8
<i>Fusicatenibacter saccharivorans</i>	0,0166	0,212	95,3
<i>Coprococcus comes</i>	0,0203	0,215	83,5
<i>Dorea longicatena</i>	0,0204	0,215	89,4
<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>	0,0191	0,215	10,6

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A espécie que verificou redução da abundância com o avançar da idade e era altamente prevalente na amostra analisada foi *Fusicatenibacter saccharivorans*, demonstramos o gráfico de abundância por idade no gráfico 12.

Gráfico 12 - Distribuição da abundância relativa da espécie *Fusicatenibacter saccharivorans* nas diferentes idades mostrando redução com o avançar da idade.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 16 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa elevou de forma significativa com o avançar da idade.

Espécies	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Enorma massiliensis</i>	0,0005	0,032	16,5
<i>Clostridium bolteae</i> CAG 59	0,0002	0,032	16,5
<i>Clostridium bolteae</i>	0,0005	0,032	34,1
<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	0,0019	0,049	47,1
<i>Citrobacter youngae</i>	0,0048	0,086	11,8
<i>Bacteroides faecis</i>	0,0063	0,103	29,4
<i>Clostridium sp</i> CAG 253	0,0099	0,148	15,3
<i>Roseburia hominis</i>	0,0143	0,198	84,7
<i>Clostridium clostridioforme</i>	0,0235	0,233	15,3

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Já as bactérias que correlacionamos positivamente com o avançar da idade não atingiram alta prevalência.

Nas demais espécies não houve diferença significativa relacionada com a idade.

4.2.1.6.3 Abundância de Espécies de acordo com o IMC

Quando a abundância relativa das amostras foi relacionada com a variável ‘IMC’, identificamos que alguns gêneros reduziram ou elevaram sua abundância com o elevar mesmo. Os resultados abaixo representam as espécies bacterianas cujas diferenças foram estatisticamente significativas através do Pacote MaAsLin para o Programa R com o valor de $p < 0,05$ e $q < 0,25$.

Tabela 17 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa reduziu de forma significativa com o elevar do IMC.

Espécies	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0,0008	0,05	90,6
<i>Alistipes inops</i>	0,002	0,06	12,9
<i>Eggerthella lenta</i>	0,003	0,07	17,6
<i>Alistipes putredinis</i>	0,003	0,07	76,5
<i>Oxalobacter formigenes</i>	0,004	0,07	22,4
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	0,004	0,08	47,1
<i>Clostridium asparagiforme</i>	0,005	0,08	23,5
<i>Ruminococcus bromii</i>	0,006	0,09	65,9
<i>Asaccharobacter celatus</i>	0,009	0,10	48,2
<i>Gordonibacter pamelaee</i>	0,009	0,10	32,9
<i>Bacteroides salyersiae</i>	0,009	0,10	28,2
<i>Alistipes finegoldii</i>	0,01	0,10	80,0
<i>Ruminococcaceae bacterium D16</i>	0,001	0,10	21,2
<i>Dorea sp CAG 317</i>	0,012	0,11	12,9
<i>Bacteroides uniformis</i>	0,013	0,11	95,3
<i>Hungatella hathewayi</i>	0,013	0,11	25,9
<i>Bacteroides intestinalis</i>	0,015	0,12	32,9
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	0,016	0,12	62,4
<i>Bacteroides dorei</i>	0,02	0,13	70,6
<i>Eisenbergiella tayi</i>	0,02	0,13	16,5
<i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>	0,02	0,13	91,8
<i>Turicimonas muris</i>	0,02	0,13	54,1
<i>Roseburia sp CAG 471</i>	0,025	0,16	27,1
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,03	0,17	38,8
<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	0,04	0,21	57,6
<i>Eubacterium sp CAG 38</i>	0,04	0,21	61,2
<i>Blautia obeum</i>	0,04	0,21	80,0
<i>Ruminococcaceae bacterium D5</i>	0,04	0,22	31,8
<i>Clostridium sp CAG 242</i>	0,047	0,23	20,0

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

As espécies com alta prevalência que apresentaram uma relação inversa com o avançar da idade foram *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis* e *Ruthenibacterium lactatiformans*.

Tabela 18 – Espécies bacterianas cuja abundância relativa aumentou de forma significativa com o elevar do IMC.

Espécies	Valores de p	Valores de q	Prevalência geral (%)
<i>Veillonella atypica</i>	0,00003	0,005	14,1
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	0,0006	0,049	25,9
<i>Butyrivibrio sp CAG 318</i>	0,002	0,06	12,9
<i>Prevotella copri</i>	0,004	0,07	50,6
<i>Enterorhabdus caecimuris</i>	0,009	0,10	17,6
<i>Holdemanella biformis</i>	0,02	0,13	24,7
<i>Desulfovibrionaceae bacterium</i>	0,035	0,20	15,3
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,037	0,21	97,6

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Nas demais espécies não houve diferença significativa relacionada ao IMC.

4.3 ÍNDICES DE DIVERSIDADE

Nas seções a seguir serão apresentados os resultados encontrados nas análises dos índices de diversidade alfa e beta.

4.3.1 Diversidades Alfa

Apresentamos os dados de diversidade Alfa na Tabela X, com os valores mínimo, máximo, média ou mediana e desvio padrão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Valores dos índices de diversidade alfa do MI distribuídas para o sexo feminino e masculino da amostra populacional analisada (n=85)

Índice	Mínimo	Máximo	Média	DP
S (Chao1)	64	245	176,8	34,96
H	2,49	3,7	3,23	0,272
D ₂	9,16	21,33	15,19	2,88
E	0,048	0,16	0,088	0,019
Raridade	0,00014	0,0685	0,00788	0,013

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Dividimos os resultados por sexo feminino e masculino e os valores dos testes estatísticos na Tabela 20.

Tabela 20 – Valores médios dos índices de diversidade alfa do MI distribuídas para o sexo feminino e masculino da amostra populacional analisada (n=85). DP – Desvio Padrão; IC – Intervalo de confiança; *Teste t; Teste de Mann Whitney**

Índice	Sexo		Valor de p
	Feminino	Masculino	
S (Chao1)	178,98 (DP 35,74)	171,85 (DP 33,26)	0,398*
H	3,24 (DP 0,285)	3,19 (DP 0,24)	0,4*
D ₂	15,34 (DP 3,01)	14,83 (DP 3,58)	0,443*
E	0,0877 (DP 0,017)	0,0895 (DP 0,023)	0,712*
Raridade	0,0054 [IC 0,0012; 0,0127]	0,0139 [IC 0,0050; 0,0246]	0,016**

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Comparamos as diversidades separadas pelos diferentes diagnósticos nutricionais, obtidas pela classificação do IMC e testes estatísticos, como pode ser verificado na tabela 21.

Tabela 21 – Valores médios dos índices de diversidade alfa do MI para as diferentes classificações do IMC da amostra populacional analisada (n=85). DP – Desvio padrão; IC – Intervalo de confiança; *ANOVA; Kruskal-Wallis**

Índice	IMC				Valor de p
	Eutrofia	Baixo peso	Sobrepeso	Obesidade	
S (Chao1)	178,43 (DP 33,87)	184,33 (DP 38,08)	172,14 (DP 43,03)	176,71 (DP 26,59)	0,897*
H	3,25 (DP 0,24)	3,3 (DP 0,15)	3,19 (DP 0,33)	3,17 (DP 0,28)	0,64*
D ₂	15,47 (DP 2,57)	16,14 (DP 2,35)	14,76 (DP 3,26)	14,67 (DP 3,4)	0,65*
E	0,0862 [IC 0,0759; 0,1018]	0,0806 [IC 0,0749; 0,1132]	0,0864 [IC 0,0758; 0,0924]	0,0883 [IC 0,0715; 0,0990]	0,988**
Raridade	0,0077 [IC 0,0015; 0,0142]	0,0160 [IC 0,0009; 0,0255]	0,0062 [IC 0,0007; 0,0227]	0,0072 [IC 0,0028; 0,0174]	0,852**

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Separámos os índices por faixas etárias: até 40 anos, de 41 a 50 anos, de 51 a 60 anos e acima de 60 anos. Os valores são apresentados na tabela 21.

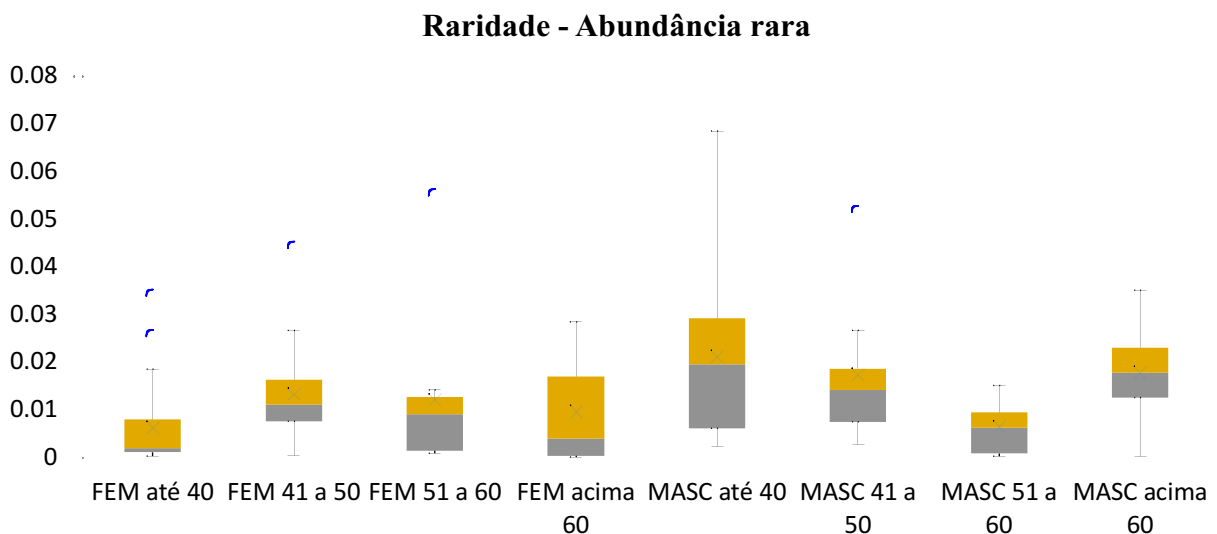
Tabela 22 – Valores médios dos índices de diversidade alfa do MI para as diferentes faixas etárias da amostra populacional analisada (n=85). DP – Desvio padrão; IC – Intervalo de confiança; *ANOVA; Kruskal-Wallis**

Índice	Faixas etárias				Valor de p
	Até 40 anos	41 a 50 anos	51 a 60 anos	Acima de 60	
S(Chao1)	173,37 (DP 32,46)	182,68 (DP 28,7)	165,14 (DP 47,81)	191,73 (DP 33,3)	0,209*
H	3,21 (DP 0,24)	3,27 (DP 0,297)	3,13 (DP 0,34)	3,298 (DP 0,22)	0,396*
D2	14,96 (DP 2,48)	15,79 (DP 3,4)	14,38 (DP 3,16)	15,78 (DP 2,7)	0,439*
E	0,0878 [DP 0,0143]	0,0875 [DP 0,189]	0,0938 [DP 0,311]	0,0844 [DP 0,0197]	0,665*
Raridade	0,0039 [IC 0,0014; 0,0150]	0,0116 [IC 0,0071; 0,0178]	0,0077 [IC 0,0011; 0,0131]	0,0117 [IC 0,0003; 0,0224]	0,21**

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Obtivemos diferença significativa no índice de raridade separado por sexos, portanto subdividimos o sexo de acordo com grupos etários: feminino até 40, de 41 a 50, de 51 a 60 e acima de 60, assim também o sexo masculino, como pode ser visto no gráfico 39.

Gráfico 13 – Distribuição da raridade de acordo com o sexo nas diferentes faixas etárias.



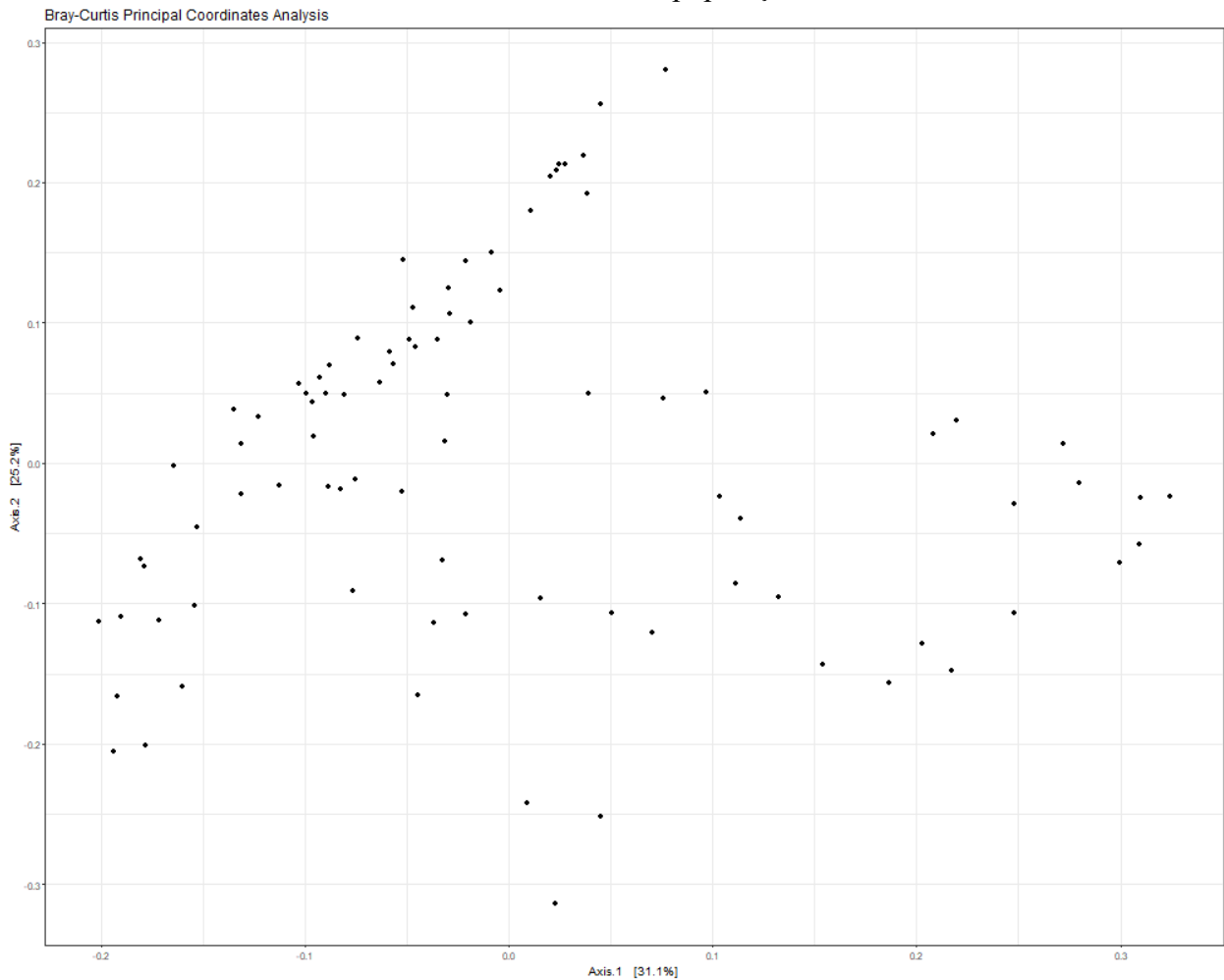
O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis mostrou que há diferenças nas Raridades entre os diferentes sexos nos diferentes grupos etários [$H(7) = 14,52$; $p = 0,04266$]. O teste post-hoc

Dunn mostrou que há diferenças entre os grupos etários Feminino até 40 anos e Feminino de 41 a 50 anos ($p = 0,034$); entre Feminino até 40 e Masculino até 40 anos ($p = 0,0058$) e entre os grupos Feminino até 40 anos e Masculino de 41 a 50 anos ($p = 0,014$).

4.3.2 Beta diversidade

A diferença entre as abundâncias bacterianas das 85 amostras foi analisada através da diversidade beta, pelo método de Bray-Curtis, obtendo a distribuição apresentada no gráfico 20.

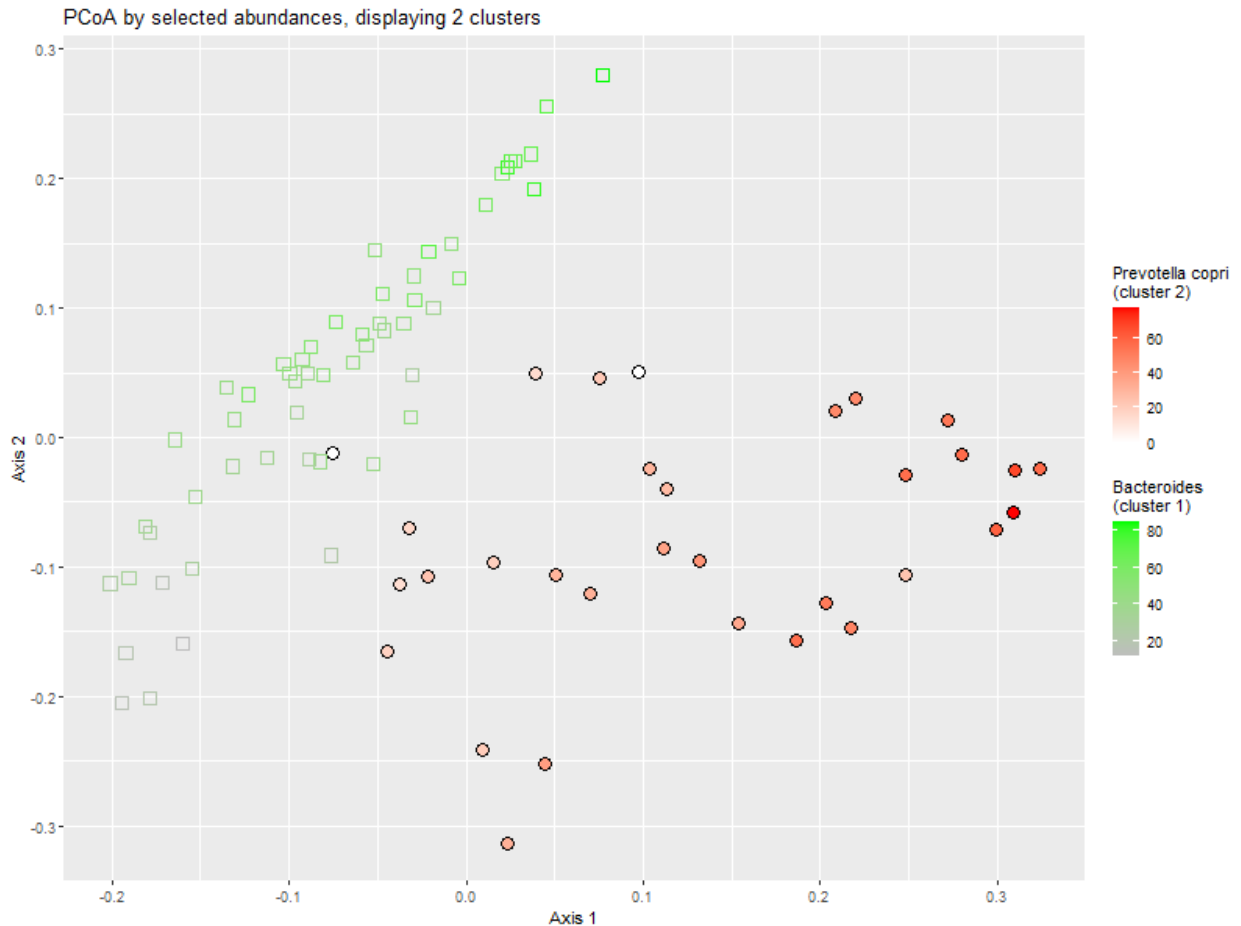
Gráfico 14 - Distribuição dos dados das diferenças entre as abundâncias das espécies do MI dos 85 indivíduos amostrados da população brasileira.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Realizamos o agrupamento em 2 clusters, sugeridos pela literatura científica em nível de gêneros bacterianos, *Bacteroides* e *Prevotella* (representado pela *Prevotella copri*), e o resultado está apresentado no gráfico 21.

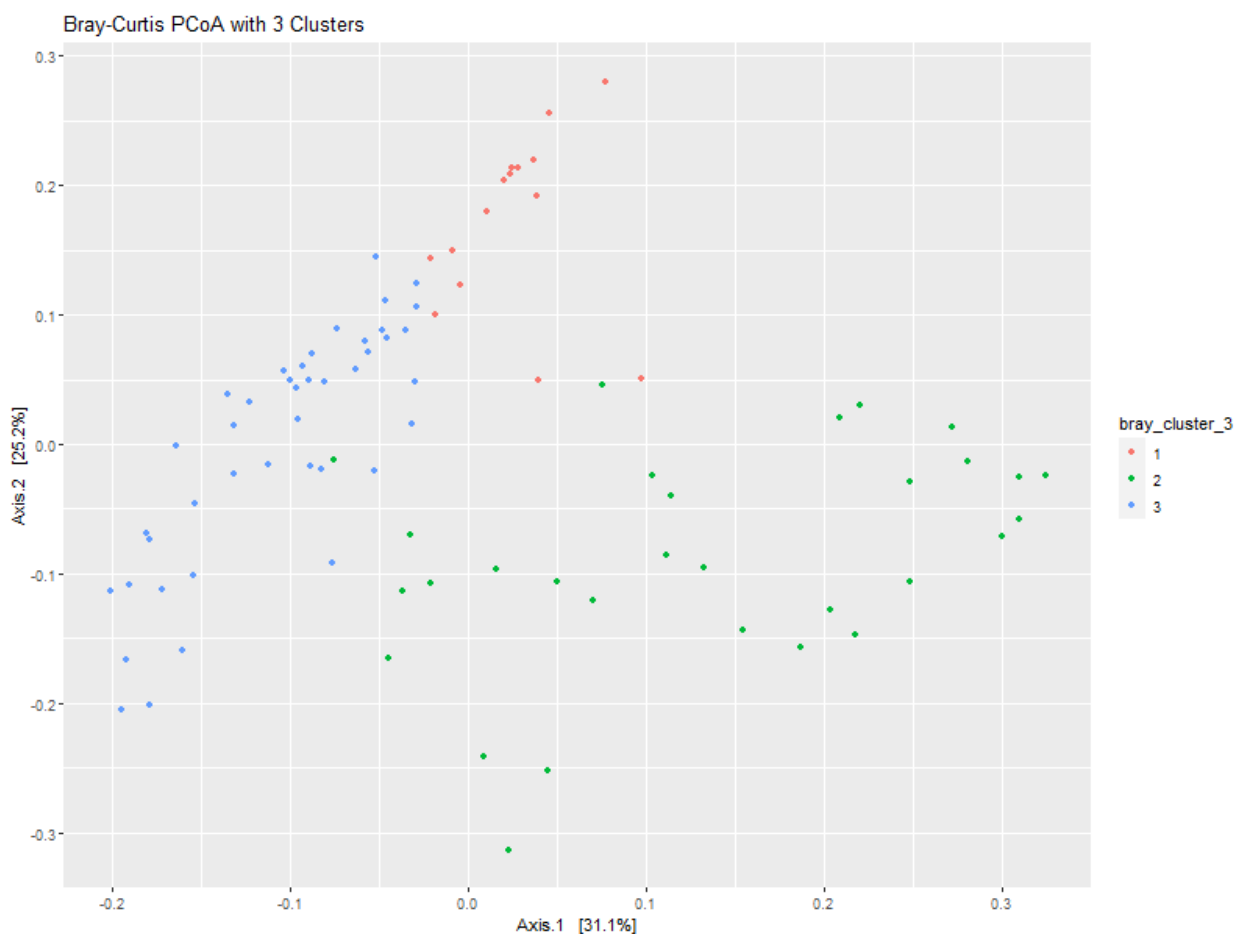
Gráfico 15 - Distribuição dos dados das diferenças, por Bray-Curtis, entre as abundâncias das espécies do MI dos 85 indivíduos amostrados da população brasileira em dois clusters, os mais abundantes em *Prevotella copri* e os mais abundantes em *Bacteroides*.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Quando adicionamos mais um cluster na amostra, portanto dividindo agora em 3 clusters, o resultado se mostrou como no gráfico 22, onde é possível verificar uma melhor divisão das amostras em enterótipos caracterizados na literatura científica.

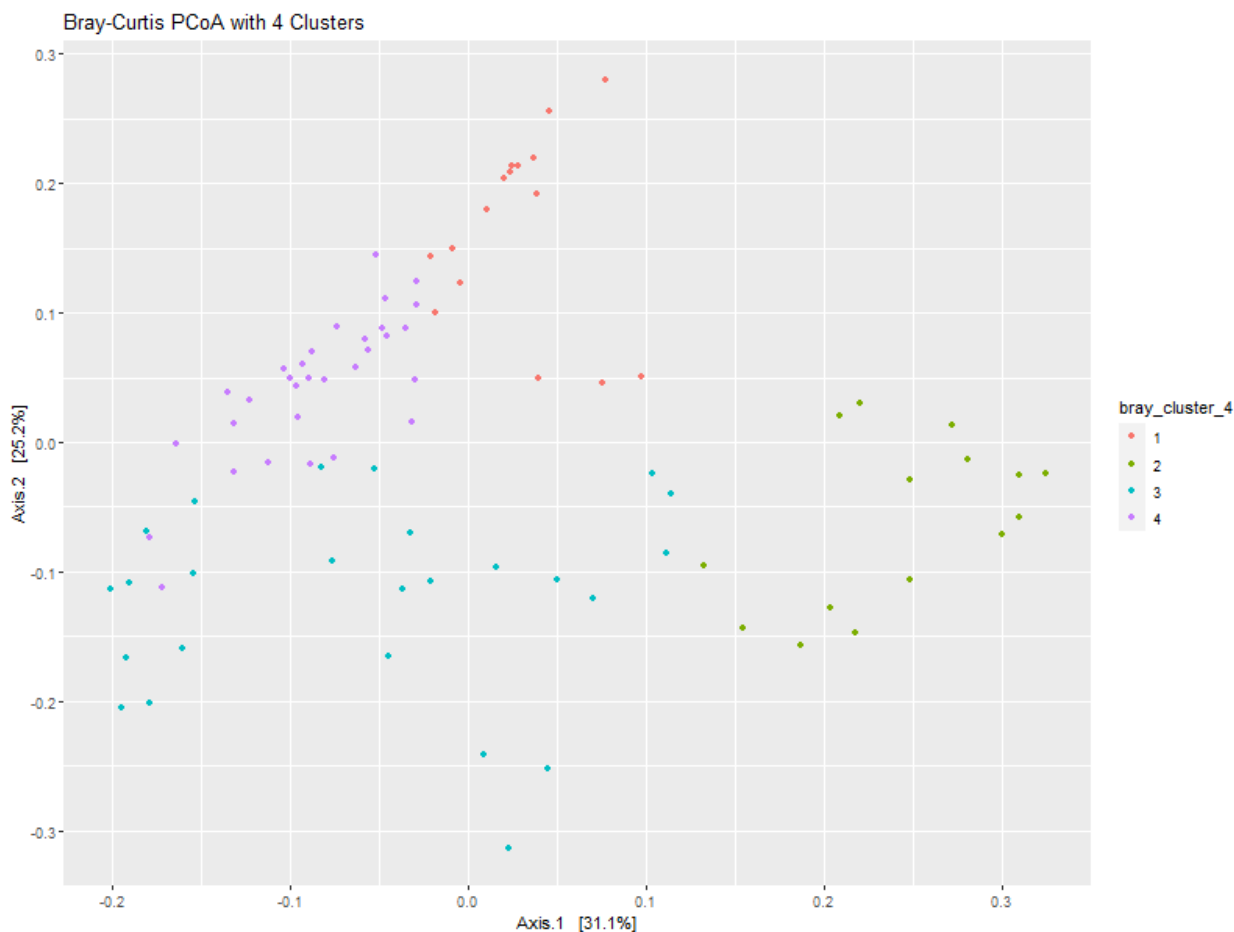
Gráfico 16. Distribuição dos dados das diferenças, por Bray-Curtis, entre as abundâncias das espécies do MI dos 85 indivíduos amostrados da população brasileira em três clusters.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Nossos resultados ainda puderam ser divididos em mais um cluster, portanto 4 clusters, como ficou representado no gráfico 23.

Gráfico 17. Distribuição dos dados das diferenças, por Bray-Curtis, entre as abundâncias das espécies do MI dos 85 indivíduos amostrados da população brasileira em quatro clusters.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

4.4 ÍNDICE DE SAÚDE DO MICROBIOMA INTESTINAL (GMHI)

Realizamos as análises de bioinformática com todas as 85 amostras do MIH conforme a metodologia proposta por Gupta *et al.* (2020).

Tabela 23 – Valores do GMHI obtidas nas amostras do MI (n=85)

Índice	Mínimo	Máximo	Mediana	IC
GMHI	-3,8	1,84	176,8	-2,69 a -0,37

Fonte: elaborada pela autora (2021).

Como o GMHI foi desenhado para distinguir entre amostras controle de indivíduos saudáveis e amostras de indivíduos com algum diagnóstico, fizemos a divisão baseada nas respostas obtidas pelo questionário.

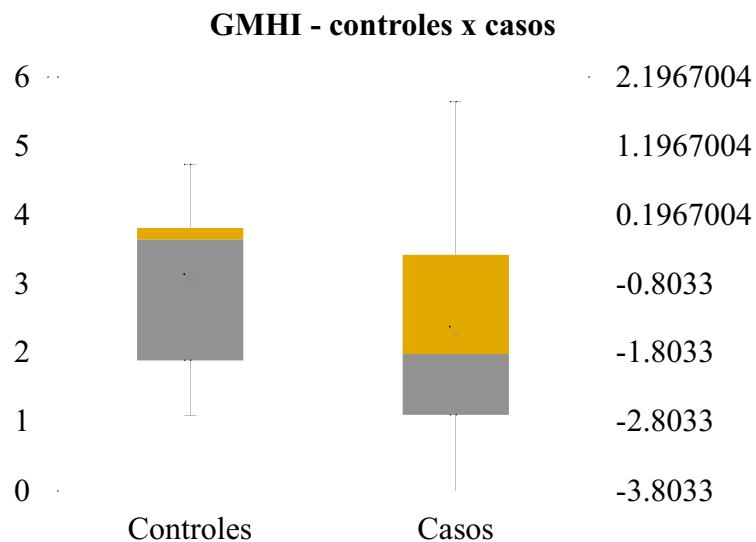
Alocamos no grupo controle todos os indivíduos que não relataram nenhum sintoma, nem diagnóstico (ver item 5.1.5), e que se encontravam dentro da escala de normalidade do IMC (eutrofia – ver item 5.1.4). No grupo dos casos, todos os que auto referiram algum sintoma, diagnóstico ou apresentaram sobrepeso ou obesidade. Com isso obtivemos 6 controles e 79 casos. Os resultados não obtiveram distribuição normal, portanto utilizamos o teste de Mann-Whitney que mostrou que não há diferença estatística entre os valores de GMHI dos controles e casos, conforme dispostos na tabela 34 e no gráfico 25.

Tabela 24 – Valores das medianas do GMHI do MI distribuídas para os controles e os casos da amostra populacional analisada (n=85). IC – Intervalo de confiança.

Índice	Controles (n=6)	Casos (n=79)	Valor de p
GMHI	-0,156 [IC -2,71; 0,93]	-1,815 [IC -3,8; 1,84]	0,103

Fonte: elaborada pela autora (2021).

Gráfico 18. Distribuição dos valores do índice GMHI do MI dos participantes do estudo classificados como controles (n=6) e casos (n=79) obtidos por este estudo.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

De acordo com os desenvolvedores do índice (GUPTA *et al.*, 2020) a abundância coletiva muito alta (ou baixa) de espécies com prevalência de saúde em relação àquela de espécies com escassez de saúde está fortemente conectada a ser saudável (ou não saudável).

5 DISCUSSÃO

Nas seções abaixo serão descritas as discussões que relacionam os resultados encontrados por este trabalho com algumas referências da literatura científica. Cada seção se refere ao âmbito relacionado a cada uma das discussões.

5.1 ABUNDÂNCIA DOS FILOS

Obtivemos, como resultado taxonômico da amostra populacional brasileira, avaliada por este estudo, maior abundância e prevalência de 5 filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobactérias, Proteobactérias e Verrucomicrobia, observados também nos grandes estudos populacionais (HMP, MetaHIT, outros), portanto, concordando com os estudos anteriores.

Mais de 90% de toda a população da microbiota intestinal humana é representada por dois filos, os Firmicutes (que inclui principalmente os gêneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Faecalibacterium*) e os Bacteroidetes (que inclui notavelmente os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*) (CASTANER *et al.* 2018; PRECUP; VODNAR, 2019; STOJANOV; BERLEC; STRUKELJ, 2020), o que foi visto neste trabalho de forma coletiva e na maioria das amostras individualmente.

A população brasileira amostrada analisada apresentou maior abundância no filo dos Bacteroidetes (65,11%), cujo resultado é semelhante aos das populações europeias, como Dinamarca, França e Espanha, mas também do continente americano, como Jamaica, e asiáticas, como Coréia e China (CLAESSON *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2017; SHIN *et al.*, 2019). Seguido por 29% de Firmicutes, valores semelhantes das referências internacionais (HUTTENHOWER, 2012; SHIN; WHON; BAE, 2015; SHIN *et al.*, 2019). Em nosso trabalho Bacteroidetes e Firmicutes somam 94,11% do total da abundância relativa geral. De forma geral a relação F/B se manteve constante, independente dos fatores (IMC, idade e sexo) relacionados ao microbioma analisados.

Quando comparado com o estudo realizado por Alencar (2017) com os índios Yanomamis brasileiros, observa-se similaridade na distribuição dos filos, pois também foi encontrado maior abundância de Bacteroidetes, seguidos pelos Firmicutes nesta população, em todas as faixas etárias. No mesmo estudo, a população urbana de Manaus também apresentou esta

distribuição, apenas nos idosos se inverteu com o aumento de Firmicutes. Já no estudo de Conteville, Oliveira-Ferreira e Vicente (2019) foi observado maiores abundâncias nos Filos Firmicutes e Proteobacterias e reduzidos em Bacteroidetes.

A população brasileira possui um hábito alimentar característico, de conhecimento mundial, que é o consumo de arroz e feijão. Alguns estudos de microbioma intestinal identificaram que o consumo de grãos, como diferentes tipos de feijões, ervilha e soja alteram a composição da microbiota intestinal e elevam a proporção de Bacteroidetes em relação aos Firmicutes (ESLINGER *et al.*, 2014; NAKATANI *et al.*, 2017; CAO *et al.*, 2019; NEIL *et al.*, 2019; HAN *et al.*, 2020). Outro alimento tradicional brasileiro é o milho. No estudo de Ou *et al.* (2016) com o consumo de oligossacarídeos ferulolados do farelo de milho houve aumento da proporção dos Bacteroidetes com relação aos Firmicutes.

Esta pode ser uma das causas da amostra da população brasileira estudada por este trabalho apresentarem esta distribuição característica. No trabalho de Alencar (2017), já foi observado na população urbana e nos indígenas de Manaus o consumo frequente destes grãos. É possível que no estudo de Conteville, Oliveira-Ferreira e Vicente (2019), com indígenas caçadores-coletores, que não possuem o hábito de consumo destes grãos, não haja esta influência sobre o microbioma, conferindo as diferenças observadas. Estudos, que levem em consideração esta possibilidade na população brasileira, são necessários para confirmar esta possível relação.

A relação entre os dois filos mais prevalentes do trato gastrointestinal Firmicutes e Bacteroidetes (Razão F/B) tem sido discutida desde o início dos estudos do microbioma (LEY *et al.*, 2005; LEY *et al.*, 2006; TURNBAUGH *et al.*, 2006; TURNBAUGH *et al.*, 2008; LEY, 2010) e se mantém até os dias atuais. No estudo de revisão realizado por Stojanov, Berlec e Strukelj (2020) esta relação é dividida em dois opostos: o aumento de Firmicutes está mais ligado à obesidade e o aumento de Bacteroidetes relaciona-se com o diagnóstico de Doença Inflamatória Intestinal.

Na revisão realizada por Magne *et al.* (2020), foi discutido que as discrepâncias entre os resultados dos estudos realizados podem ser explicadas pela existência de viés interpretativo, gerado por diferenças metodológicas no processamento de amostras e análise de sequência de DNA, ou pela caracterização geralmente pobre dos indivíduos recrutados e, mais particularmente, a falta de consideração de fatores associados ao estilo de vida conhecidos por afetar composição e/ou diversidade da microbiota. Por esses motivos, atualmente é difícil associar a razão

Firmicutes/Bacteroidetes a um determinado estado de saúde e, mais especificamente, considerá-la uma marca registrada da obesidade.

Uma associação interessante a ser considerada nesta relação F/B é a da latitude, no trabalho de Suzuki e Worobey (2014), associaram positivamente o filo Firmicutes e latitude, já com Bacteroidetes a relação foi inversa. Portanto, no caso do Brasil, na amostra estudada, esta relação faz sentido.

Outro ponto de vista desta relação (F/B) que pode ser relacionada aos nossos achados é a temperatura. Mamíferos de grande porte, além de aves, répteis e anfíbios, criados em diferentes temperaturas, apresentaram diferentes distribuições de filos, sendo que o aumento da temperatura foi relacionada à redução no filo dos Firmicutes na microbiota intestinal destes animais (SEPULVEDA; MOELLER, 2020),

A abundância relativa média total do filo Proteobacteria obtida pela análise deste trabalho (2,71%) se aproximou de valores obtidos por Shin *et al.* (2019) (3,3%).

Foi possível relacionarmos, de forma direta, a abundância relativa do Filo Proteobacteria com a elevação da idade ($p = 0,001$; $q = 0,0085$). Este aumento nas Proteobacterias foi identificado em estudos anteriores (ODAMAKI *et al.*, 2016), portanto nossos resultados vão ao encontro destes achados. É um dos filos mais abundantes na microbiota intestinal humana composto por membros anaeróbios facultativos (SHIN; WHON; BAE, 2015). Em populações tradicionais observa-se um aumento na sua abundância relativa quando comparado com populações industriais (JHA *et al.*, 2018). No trabalho realizado por Forster *et al.* (2019), as Proteobacterias estavam enriquecidas em 389 funções dominadas pela frutose bisfosfatase, glucoquinases e reguladores de formação de cluster de ferro. Shin, Whon e Bae (2015) propõem que um aumento da prevalência do filo bacteriano Proteobacteria é um marcador para uma comunidade microbiana instável (disbiose) e um potencial critério de diagnóstico para a doença.

Como abordado anteriormente neste trabalho, a colonização intestinal pelas bactérias anaeróbias facultativas no início da vida neonatal (até 16% de abundância) parece ser benéfica, conferindo um importante papel às Proteobacterias como promotoras de um ambiente favorável aos anaeróbios estritos pela mudança no pH intestinal. Mas a elevação deste filo ao longo da vida adulta, em populações urbanas, tem sido relacionada a estados de disbiose intestinal, como em casos de cirurgia bariátrica (9,7%), distúrbios metabólicos (13,2%), inflamação e câncer (14,9%). O aumento deste filo pode refletir instabilidade da comunidade microbiana intestinal que, se em

equilíbrio, impediria este avanço devido à relação simbiótica com o sistema imune do hospedeiro. O percentual proposto para um estado de saúde é de até 4.5%, sendo normalmente próximo do valor limite em mulheres e menor em homens (SHIN; WHON; BAE, 2015).

No trabalho realizado por Forster *et al.* (2019), dentro do filo das Actinobactérias as funções enriquecidas eram limitadas, e as identificadas foram principalmente associadas ao metabolismo de carboidratos e lipídios.

Encontramos em nossa amostra uma menor abundância relativa média para o filo Synergistetes em homens, portanto aumentado em mulheres. Encontramos apenas 3 espécies deste filo, *Cloacibacillus evryensis*, *Cloacibacillus porcorum* e *Fretibacterium fastidosum*. Este filo é encontrado em diferentes habitats, incluindo solo (vinhedos, pântanos doces e salgados, entre outros), vísceras de animais e insetos, fezes de animais, dentre outros. Em humanos foram isolados da cavidade oral, fezes e amostras de cirurgia ginecológica e estão associados a doenças periodontais (MCCRACKEN; GARCIA, 2021). No estudo de BUI *et al.* (2019) *Cloacibacillus evryensis* e *Oscilibacter* foram os únicos a conseguirem degradar compostos de glicação avançada (AGEs). Portanto, pode estar relacionado ao consumo destes compostos na alimentação industrializada “crocante”.

5.2 ABUNDÂNCIA DAS FAMÍLIAS

Obtivemos maior abundância relativa nas famílias Bacteriaceae, seguida pelas famílias Prevotellaceae e Ruminococcaceae. Discutiremos mais amplamente no tópico dos gêneros.

Em nosso trabalho, a família Enterobacteriaceae obteve 1,27% da abundância relativa total, com distribuição entre os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera* e *Raoultella*. No trabalho realizado por Salosensaari *et al.* (2021), estudo prospectivo com acompanhamento de uma coorte de 7.211 indivíduos da população finlandesa, foi possível relacionar com significância estatística o microbioma intestinal e associação positiva com causas de mortalidade com o aumento dos gêneros *Escherichia*, *Shigella* e *Kluyvera*. As causas de mortalidade fortemente associadas foram gastrointestinais, respiratórias, cânceres, neurológicas. Normalmente a família Enterobacteriaceae é enriquecida no trato gastrointestinal (TGI) superior, e que um trânsito fecal mais rápido (como ocorre na diarreia) eleva a presença desta no TGI inferior. A abundância total aumentada da família Enterobacteriaceae está relacionada com doenças

do fígado, e análises mais aprofundadas de genes relacionam a maior mortalidade desta família às cepas mais virulentas de *Escherichia coli*. Estudos observaram que Enterobacteriaceae é enriquecido em pacientes com doença inflamatória intestinal e câncer colorretal. No estudo em modelo animal de Robles-Vera *et al.* (2019) a deficiência em vitamina D resultou em aumento de abundância relativa de Enterobacteriaceae.

A família Lachnospiraceae atingiu uma abundância relativa de 9,25% na abundância relativa total, subdividindo-se nos gêneros *Anaerostipes*, *Anaerotignum*, *Blautia*, *Butyrivibrio*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eisenbergiella*, *Fusicatenibacter*, *Lachnoclostridium*, *Lachnospira*, *Marvinbryantia*, *Roseburia* e *Sellimonas*. No trabalho de Salonsensaari *et al.* (2021) uma relação não linear foi estabelecida para o gênero *Anaerostipes* e causa de mortalidade geral da população, como já mencionado anteriormente.

Em nosso trabalho a família Sutterellaceae obteve 0,53% da abundância total com uma distribuição de 90% em todas as amostras, portanto uma alta prevalência. Divide-se nos gêneros *Parasutterella* e *Sutrerella*. O gênero *Parasutterella* foi associado negativamente à mortalidade (Figura suplementar 6) (SALOSENSAARI *et al.*, 2021).

Alguns estudos relatam o enriquecimento da família Christensenellaceae em indivíduos com IMC classificado em desnutrição (ZHANG; ZHAO, 2016; AZCARATE-PERIL *et al.*, 2017), o que não foi encontrado nas amostras analisadas pelo presente estudo, tendo a presença desta família em apenas 1 indivíduo classificado no IMC de obesidade. Portanto, para analisar a participação desta família de bactéria na população brasileira, há a necessidade de um maior número amostral de indivíduos desta população.

5.3 ABUNDÂNCIA DOS GÊNEROS

Em seu trabalho, Falony *et al.* (2016) analisaram amostras fecais da iniciativa FGFP e da coorte Dutch, ambos com a tecnologia 16S rRNA, adicionados de duas grandes coortes do Reino Unido e dos EUA, somando um total de dados de 4000 indivíduos. Encontrou nestes indivíduos uma riqueza total de 664 gêneros, mas que a extrapolação da riqueza ocidental seria de 784 ± 40 gêneros. Neste mesmo trabalho é sugerido que para alcançar tal riqueza, seria necessária uma amostragem de mais de 40.739 indivíduos.

Utilizando o conceito de núcleo aplicada por Falony *et al.* (2016), dos 128 gêneros bacterianos que identificamos apenas 8 gêneros pertenceram ao centro/núcleo (“core”) do microbioma. Para fazer parte do núcleo, faz-se necessário que, o gênero bacteriano, atinja no mínimo 95% de prevalência, no coletivo dos metagenomas. Assim, encontramos *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Fusicatenibacter*, *Blautia* e *Dorea*. Em outros estudos (FALONY *et al.*, 2016; GUPTA *et al.*, 2017) verificou-se que havia no mínimo 14 gêneros. Dentre as diferenças encontradas em nosso trabalho, identificamos os *Parabacteroides* como membros do núcleo, o que não aconteceu nos anteriores. A obtenção de um núcleo bem menor pode estar relacionado ao tamanho da amostra ou às características relacionadas à população estudada.

Os que não encontramos no núcleo em nosso trabalho, pois obtiveram menor distribuição geral (menor que 95%), comparando com os metagenomas de referência (FALONY *et al.*, 2016) foram uc_Lachnospiraceae, uc_Ruminococcaceae, uc_Erysipelotrichaceae, Coprococcus, uc_Clostridiaceae, uc_Hyphomicrobiaceae, Clostridiales, uc_Veillonellaceae e *Clostridium XIVa*.

A dominância da abundância relativa em nível de gênero foi dos *Bacteroides* (34,75%) na amostra analisada por este trabalho. Esta dominância se relaciona em proporções com as populações dos Estados Unidos da América (EUA), China, Espanha e Dinamarca, descritas em seu trabalho por Gupta, Paul e Dutta (2017). Desta forma, propomos o uso deste gênero para representar a população brasileira.

Foi seguido pelo gênero *Prevotella*, ocupando o segundo lugar de maior abundância na amostra, impulsionado principalmente pela abundância da espécie *Prevotella copri*, mas não unicamente, sendo identificadas no total 21 espécies deste gênero. O gênero *Prevotella* possui maior abundância relacionada com os povos tradicionais caçadores-coletores, sendo uma das espécies dos taxa VANISH abordados anteriormente (YATSUNENKO *et al.*, 2012; SMITS *et al.*, 2017; FRAGIADAKIS *et al.*, 2019). Então é possível relacionar esta presença com um perfil ainda conservado de taxa bacterianos. Ainda no estudo de Fragiadakis *et al.* (2019) é levantado um ponto interessante quando é observada redução da abundância da família Prevotellaceae no período das chuvas nos Hadza, sendo uma época em que há maior consumo de água, as fontes de água são renovadas. Com isso podemos levantar a questão da relação da abundância de água com esta

família e gênero. Ou de forma mais ampla, relacionar com as mudanças da estação do ano (SEPULVEDA; MOELLER, 2020). Estes pontos não foram analisados por este trabalho.

Uma característica importante da amostra analisada é que verificamos o que foi descrito por Wibowo *et al.* (2021) nas amostras industrializadas: maior abundância dos gêneros *Bacteroides* e *Alistipes*, o que ocorreu em nosso trabalho, apesar de *Prevotella* ser muito abundante.

Quando analisados os gêneros comparados com os valores de IMC, observamos que em nosso trabalho houve redução dos gêneros *Bacteroides*, *Allistipes*, *Coproacter*, *Bifidobacterium* e *Agathobaculum* com a elevação do IMC.

Em um trabalho realizado por Chávez-Carbajal *et al.* (2019) com mulheres mexicanas, a redução do gênero *Bacteroides* também foi observado nas que apresentavam obesidade e obesidade com síndrome metabólica quando comparadas com as mulheres controle. No trabalho de Lippert *et al.* (2017), a maior abundância de *Bacteroides* se relacionou a uma melhor tolerância à glicose e redução da incidência de síndrome metabólica. Portanto, a redução da abundância deste gênero com o aumento do IMC pode estar relacionada a complicações metabólicas relativas ao aumento de peso e gordura corporal.

Encontramos uma relação direta, estatisticamente significativa, dos gêneros *Anaerotignum*, *Prevotella*, *Acidaminococcus*, *Collinsella* e *Harryflintia* com o aumento do IMC. Na literatura científica também foi possível associar alguns destes gêneros com marcadores para obesidade. Em estudo comparando a microbiota intestinal de indivíduos com peso normal, obesos e pós-bypass gástrico, foi observado que indivíduos obesos eram mais propensos a abrigar *Prevotella* e Archaea metanogênicas. Os autores propuseram que os metanógenos removiam o hidrogênio produzido por *Prevotella*, permitindo que o *Prevotella* produzisse de forma mais eficiente os ácidos graxos de cadeia curta, que eram absorvidos pelo hospedeiro, contribuindo para a obesidade do hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2009; MORGAN; SEGATA; HUTTENHOWER, 2013).

No trabalho de Gao *et al.* (2018) também identificaram aumento gradativo do gênero *Prevotella* de forma significativa, partindo dos indivíduos de baixo peso para os com peso normal e para os com sobrepeso. Também encontraram aumento de *Bifidobacterium* relacionado ao aumento de peso em mulheres, o que em nosso trabalho se mostrou de forma inversa, pois encontramos redução de *Bifidobacterium* com o aumento de IMC.

No trabalho realizado por Aranaz *et al.* (2021) com 361 indivíduos adultos participantes do estudo OBEKIT, o gênero *Prevotella* foi associado ao estado de alto grau de inflamação relacionado à obesidade e o gênero *Collinsella* ao baixo grau de inflamação relacionado à obesidade. Quando analisamos o gráfico do nosso trabalho podemos observar que o ângulo de aumento dos gêneros acima referidos, com a elevação do IMC, é muito maior para o gênero *Prevotella* do que para o *Collinsella*, indicando o aumento expressivo de *Prevotella* com a elevação do peso corporal.

Hjorth *et al.* (2018) verificaram que adultos que seguiram uma alimentação mais rica em fibras e grãos inteiros (Recomendações Nutricionais Nórdicas) e possuíam uma relação maior entre *Prevotella/Bacteroides*, perderam maior quantidade de gordura corporal e circunferência de cintura do que os com relação mais baixa. O consumo de fibras na presença de maior relação *Prevotella/Bacteroides* beneficiou a perda de peso e a sensibilidade à insulina, e a tolerância à glicose (KOVATCHEVA-DATCHARY *et al.*, 2015; PEDERSEN *et al.*, 2016). Outra relação encontrada na literatura científica, que se associa ao ganho de peso e à obesidade, é a esteato-hepatite não alcoólica (NAFLD), e o enriquecimento da microbiota em *Prevotella* exacerbou esta condição em modelos animais (LARSEN, J. 2017). Outras discussões relacionadas à espécie *P. copri* serão abordadas na próxima seção.

Em nosso trabalho 23 gêneros apresentaram-se significativamente associados ao sexo. Encontramos no sexo feminino aumento de *Bacteroides*, *Alistipes*, *Eggerthella* (principalmente a abundância relativa da espécie *Eggerthella lenta*), *Oxalobacter*, *Adlercreutzia*, *Asaccharobacter*, *Gordonibacter*, *Hungatella*, *Lachnoclostridium*, *Anaeromassilibacillus*, *Ruthenibacterium*, *Eisenbergiella* e *Intestimonas*. No sexo masculino encontramos *Phascolarctobacterium*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Anaerotruncus*, *Enterorhabdus*, *Holdemanella*, *Turicimonas*, *Faecalibacterium* (*Faecalibacterium prausnitzii*), *Desulfovibrionaceae* e *Enterobacter*.

Assim como em nosso estudo, o estudo de Takagi *et al.* (2018) e Mayneris-Perxachs *et al.* (2020) dentre outros gêneros e espécies, *Prevotella* foi encontrado aumentado em homens.

Com relação à idade, o gênero *Citrobacter*, que pertence à família Enterobacteriaceae, elevou-se de forma importante com o avançar da idade, relacionando-se com o observado em outros estudos. No estudo de Rampelli *et al.* (2020), conforme abordado anteriormente, viu-se que os genes para LPS aumentaram com a idade e foram relacionados à família Enterobacteriaceae. Ainda na literatura Salosensaari *et al.* (2021) associaram Enterobacteriaceae a causas de

mortalidade gastrointestinais, respiratórias, cânceres e neurológicas. No estudo de Robles-Vera (2019) os níveis de Enterobacteriaceae aumentaram em modelos animais com reduzidos níveis de vitamina D, não analisamos parâmetros sanguíneos neste trabalho, mas valores reduzidos de vitamina D também estão associados ao envelhecimento pela redução na exposição solar. Sendo uma interessante variável a ser analisada em próximos estudos.

5.4 ABUNDÂNCIA DAS ESPÉCIES

Encontramos 357 espécies em nossa amostra. Discutiremos, as espécies observadas nos resultados deste trabalho, a partir de ângulos distintos: as 13 espécies mais abundantes, as de prevalência acima de 90%, além das que estão em ambos os grupos, totalizando 15 espécies discutidas aqui.

No estudo de Kraal *et al.* (2014), com 100 amostras de WGS de indivíduos saudáveis do HMP analisadas, foi possível identificar que algumas cepas são incomumente variáveis, concluindo que cepas com padrões de distribuição altamente variáveis podem revelar bases para a variabilidade ligada à microbiota na população humana. Mesmo em uma comunidade tão complexa como o intestino, apenas 7,3 espécies respondem por 80% das leituras mapeadas na amostra média de fezes, e apenas 2,8 espécies respondem por 50%. Comunidades dominadas pelo mesmo gênero podem diferir dramaticamente no nível de espécie. Em seu trabalho encontraram duas configurações comuns de amostras ricas em *Bacteroides*, uma delas dominada por *B. ovatus* ou *B. vulgatus*, enquanto configurações mais raras apresentam *B. eggerthii*, *B. cellulosilyticus*, *B. fragilis* ou *B. dorei* como a cepa mais abundante. Dada a heterogeneidade das espécies de *Bacteroides*, uma comunidade dominada por *B. vulgatus* pode muito bem ser tão fenotipicamente diferente de uma comunidade dominada por *B. ovatus* quanto qualquer uma é de uma comunidade dominada por *Prevotella*. Em Lloyd-Price *et al.* (2017) foi encontrado como bactérias mais prevalentes *B. dorei*, *B. fragilis*, *A. finegoldii*, *A. onderdonkii*, entre outras, muito semelhante ao encontrado em nosso trabalho, como visto anteriormente.

Encontramos resultados semelhantes aos estudos de Mayneris-Perxachs *et al.* (2020) em relação à distribuição de uma espécie quanto às diferenças entre os sexos, com a redução na abundância de *Bacteroides dorei* em homens, com consequente aumento em mulheres.

Assim também nos estudos de Gao *et al.* (2018) e Takagi *et al.* (2018) foi identificado maior abundância de *Ruminococcus* em mulheres, em nosso trabalho encontramos aumento de *Ruminococcaceae bacterium* D16 e *Ruminococcaceae bacterium* D5 em nossas amostras femininas.

No estudo de Gupta *et al.* (2020) em que compilaram dados metagenômicos de 34 estudos com indivíduos saudáveis e 12 estudos com indivíduos não saudáveis, em um total de 4347 amostras de microbioma intestinal humano, apenas 6 espécies atingiram a prevalência maior que 90%, e foram *B. ovatus*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *F. prausnitzii*, *R. obeum* e *R. torques*. Em nosso estudo identificamos 7 espécies de alta prevalência, que foram *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *P. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, *F. prausnitzii*, *Fusicatenibacter saccharivorans* e *R. lactatiformans*. Portanto encontramos semelhança de apenas três espécies com este grande compilado de estudos.

Em nosso conjunto de dados, com as 85 amostras obtivemos 90 espécies em distribuição acima de 0,1% de abundância relativa, comparando com o mesmo estudo de Gupta, foram encontradas 313 espécies. Devido à grande soma de dados utilizados por Gupta (2020) podemos considerar nossos dados relevantes.

5.4.4 Espécies mais abundantes e mais prevalentes de toda amostra

5.4.4.1 Bacteroides uniformis

Em nosso trabalho, *Bacteroides uniformis* esteve presente em 95,29% das amostras, com 10,06% da abundância relativa média geral em todas as amostras, representando uma grande importância nos dados amostrados. De forma individual sua abundância variou de 0 a 31,5%. Identificamos que a abundância de *B. uniformis* se apresentou menor em homens do que em mulheres e reduziu a abundância com a elevação do IMC. Faz parte do Filo dos Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem dos Bacteroidales, Família Bacteroidaceae e do Gênero *Bacteroides*. Células de espécies de *Bacteroides* são obrigatoriamente anaeróbicas, não formadoras de esporos, não móveis, bastonetes Gram-negativos (SAKAMOTO; BENNO, 2006).

Bacteroides uniformis faz parte da microbiota tradicionalmente mais abundante em humanos (QIN *et al.*, 2010) e foi encontrado em maior abundância em crianças, de recém-nascidas

até 4 meses de idade, alimentadas com leite materno, e também em crianças com baixo risco genético para o desenvolvimento de doença celíaca, identificados pelos genes HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 (SANCHEZ *et al.*, 2011). No trabalho de Leonard *et al.* (2020) nos bebês não expostos ao meio ambiente de maior risco para doença celíaca (parto normal, sem uso de antibiótico e amamentação exclusiva) foi observado que a abundância de *Bacteroides uniformis* aumenta monotonicamente durante os primeiros 6 meses após o nascimento.

B. uniformis CECT 7771 apresentou capacidade de induzir altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, juntamente com baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias após a estimulação de macrófagos em culturas. Ainda, efeitos positivos em camundongos com e sem obesidade induzida por dieta foram observados. Reduziu o ganho de peso corporal e melhorou o metabolismo lipídico, diminuindo a esteatose hepática e os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em camundongos obesos. Esta cepa também reduziu os níveis de leptina e melhorou o metabolismo da glicose, uma vez que diminuiu as concentrações de glicose sérica e insulina em jejum, melhorando, portanto, a tolerância à glicose (GALFFIN-CANO, 2012).

A administração de *B. uniformis* a camundongos imunossuprimidos reverteu a redução da altura das vilosidades e melhorou a profundidade da cripta, aumentou o número de células caliciformes no cólon, melhorando a primeira linha de defesa antes da ativação do sistema imunológico. Foi observado também os efeitos de *B. uniformis* na ativação de TLR que desempenham um papel crítico na resposta imune inicial aos microrganismos invasores ou comensais, mas não houve resposta mediada em nenhum dos tecidos analisados, indicando ausência de ativação da resposta inflamatória ou disfunção da barreira intestinal. Houve redução de Interferon-gama em camundongos imunossuprimidos, além de reduzir a expressão gênica e proteica de iNOS e reduziu a superexpressão de PPAR γ . Mas os mecanismos pelos quais ocorre a indução da tolerância precisam de mais investigação. Nenhum efeito adverso foi observado (FERNANDEZ-MURGA; SANZ, 2016). Não foi observada translocação bacteriana do lúmen intestinal para o sangue em ratos e os níveis citocinas anti-inflamatórias foram aumentados no intestino com o uso de 10^{10} UFC. Foi observado que neste mesmo grupo a abundância de *Christensenella* e *Akkermansia muciniphila* estavam aumentados (PULGAR; BENITEZ-PAEZ; SANZ, 2020).

No estudo de Zeybel *et al.*(2021) no microbioma intestinal, as abundâncias das espécies pertencem aos Bacteroidales (*Alistipes finegoldii*, *Alistipes putredinis*, *Bacteroides dorei*,

Bacteroides stercoris, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus*, *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides merdae*) se relacionaram positivamente de forma significativa com numerosas estruturas lipídicas e correlacionadas negativamente com os metabólitos secundários do ácido biliar, peptídeos e aminoácidos específicos (gama-glutamil-alfa-lisina, S-adenosil-homocisteína, gama-glutamil treonina e treonina) relacionados a esteatose hepática. Observaram que a abundância de *Bacteroides uniformis*, esteve significativamente aumentada em indivíduos com esteatose moderada *versus* aqueles sem esteatose.

5.4.4.2 *Bacteroides vulgatus*

Bacteroides vulgatus apresentou prevalência de 91,76%, com 6,98% da abundância relativa média no geral das amostras. De forma individual a abundância variou de 0 a 20,2%. É uma bactéria gram-negativa que faz parte do Filo dos Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem dos Bacteroidales, Família Bacteroidaceae e do Gênero *Bacteroides*.

Bactéria sacarolítica que produz, como produtos de fermentação, succinato, ácido acético, ácido láctico e traços de propionato. Não produz butirato, e valerato a partir da glicose (CATO; JOHNSON, 1976).

O papel desta espécie nos desfechos de saúde e doença na literatura foram primeiro relacionados a quadros patológicos, mas o contínuo estudo revelou que algumas cepas podem ser benéficas. Sua primeira implicação esteve relacionada à inflamação ligada à colite ulcerativa (ONDERDONK; BRONSON; CISNEROS, 1987) ou como protetora quando associada a colite provocada por *E. coli*, mas não *E. coli* Nissle (WAIDMANN *et al.*, 2003). No trabalho de Steimle *et al.* (2016) *Bacteroides vulgatus* causou uma regulação da atividade de catepsina S dependente de cistatina C que está envolvida na geração de células dendríticas intestinais tolerantes, contribuindo para a prevenção da indução de inflamação colônica mediada por células T. Em seguida isolaram o LPS de *Bacteroides vulgatus* cepa mpk que fornece uma atividade agonística fraca, por ativação de TLR4, que leva a melhora na resposta inflamatória em modelo animal de colite restaurando a homeostase imune intestinal eliminando os sintomas de inflamação (STEIMLE *et al.*, 2019). Portanto *Bacteroides vulgatus* cepa mpk se mostrou capaz de exercer propriedades imunomoduladoras, levando à prevenção da indução de colite em vários modelos de camundongos para colite experimental fundindo propriedades antagonistas e agonistas de TLR4. Portanto pode-

se especular que o LPS (principalmente pela estrutura hipoaciladas do lipídio A) de *B. vulgatus* desempenha um papel fundamental nas respostas imunes do hospedeiro ao equilibrar a inflamação excessiva potencialmente induzida pela IL-6 com a atividade antiinflamatória da IL-10 (DI LORENZO *et al.*, 2020).

Estudos iniciais revelaram maior prevalência de *B. vulgatus* associada ao genótipo de maior risco de desenvolvimento de doença celíaca em crianças até 4 meses de idade (SANCHEZ *et al.*, 2011). Mas nos estudos de Leonard *et al.* (2020) em bebês de até 6 meses de idade e com risco genético aumentado para desenvolvimento de doença celíaca, viu-se que o parto cesáreo está associado a uma diminuição da abundância de bactérias benéficas como *Bacteroides vulgatus* e *Bacteroides dorei* e da via de biossíntese do folato, metabolismo da riboflavina e com um aumento da abundância de ácido hidroxifenilacético. Estas alterações estão implicadas na disfunção do sistema imunológico e condições inflamatórias relacionadas ao aumento de risco de desenvolvimento de doença celíaca em crianças.

No trabalho de Dewulf *et al.* (2013) o uso de prebióticos (inulina e oligofrutose) em mulheres obesas reduziram *B. vulgatus* e outras bactérias, o que foi relacionado à redução de gordura corporal e nos níveis de lactato e fosfatidilcolina no plasma. Esta redução ocasionada pelo uso de prebióticos foi correlacionada com a melhora na homeostase da glicose.

No estudo conduzido por Ridaura *et al.* (2013) demonstrou a capacidade invasiva e de colonização de *B. vulgatus* e *B. uniformis* em camundongos que compartilharam a mesma gaiola, independente da colonização inicial ou da dieta consumida. E que estas espécies se associaram fortemente e positivamente ao aumento do nível de propionato no ceco dos camundongos magros.

Bacteroides vulgatus se relacionou positivamente com a elevação da produção de triptofano, lipopolissacarídeos (LPS) e aminoácidos de cadeia ramificada, mas não o transporte deste último pelas bactérias, podendo contribuir com o quadro de resistência à insulina e intolerância à glicose em humanos adultos não diabéticos, a partir da elevação de aminoácidos de cadeia ramificada no plasma e outras funções microbianas, como será discutido no tópico *Prevotella copri*, pois ambas as espécies apresentaram metabolismo semelhante nesta questão, apesar de serem significativamente anticorrelacionadas. Uma das vias mais enriquecidas em *B. vulgatus*, e menos comuns em bactérias, para a produção de BCAA é a da enzima d-citramalato sintase que produz isoleucina independente de treonina e obteve correlação positiva com o HOMA-IR (PEDERSEN *et al.*, 2016).

Por algumas evidências na literatura científica de que o gênero *Bacteroides* estava reduzido em doenças cardiovasculares, Yoshida *et al.* (2018) identificaram elementos da microbiota intestinal que se relacionaram com doença arterial coronariana (DAC) e puderam relacionar que *B. vulgatus* e *B. dorei* estavam reduzidos em pacientes com DAC e *F. prausnitzii* e *P. copri* de apresentaram aumentados nestes pacientes. Além disso, os níveis de lipopolissacarídeos fecais em pacientes com DAC foram significativamente maiores e correlacionados negativamente com a abundância de *B. vulgatus* e *B. dorei*. Então projetaram um modelo de camundongo com tendência de aterosclerose e administraram por gavagem *B. vulgatus* e *B. dorei*, verificando que foram capazes de atenuar a formação de lesões ateroscleróticas, melhorando marcadamente a endotoxemia, seguida pela diminuição da produção de lipopolissacarídeo microbiano no intestino, suprimindo efetivamente as respostas imunes pró-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, INF γ , TNF α). Identificaram que nestes camundongos a expressão de MHC-II e CD86, bem como aumento de expressão de moléculas co-inibitórias ligantes de morte programada 1 e 2 em células esplênicas, consistente com uma tolerogenicidade fenotípica, além de redução de células T CD4+. Ainda foi observado menor permeabilidade intestinal nos animais que receberam estas espécies com expressão de mRNA e proteína do gene ZO-1 de junções apertadas (*tight junction*).

5.4.4.3 *Parabacteroides distasonis*

Parabacteroides distasonis apresentou abundância relativa geral média de 2,2% e foi detectado em 94,12% das amostras, apresentando uma alta prevalência e uma abundância importante. De forma individual variou de 0 a 9,1% na abundância das amostras deste estudo. São Gram-negativas, obrigatoriamente anaeróbicas, não formadoras de esporos, não móveis e em forma de bastonete (SAKAMOTO; BENNO, 2006), pertencentes ao Filo Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem Bacteroidales, Família Tannerellaceae, Gênero *Parabacteroides*.

São sacarolíticos produtores de succinato e ácido acético, crescem em meio contendo 20% de bile (SAKAMOTO; BENNO, 2006). O gênero *Parabacteroides* possui as vias de produção de putrescina na degradação de histidina e produção de tetraidrofolato, mas é possível que as vias de putrefação identificadas em *Parabacteroides* possam funcionar apenas sob certas condições, quando a bactéria apresenta patogenicidade. Foi um dos gêneros associados à coorte saudável em relação à coorte com câncer colo-retal, indicando que estes metabólitos podem ser usados para

benefício da própria bactéria ao invés de exercer efeitos prejudiciais à coorte saudável (KAUR; DAS; MANDE, 2017).

Como uma das principais bactérias comensais do intestino, a abundância de *P. distasonis* foi negativamente correlacionada com doenças inflamatórias intestinais (DIIs), esclerose múltipla (CEKANAVICIUTE *et al.*, 2017), NAFLD e obesidade (WANG *et al.*, 2019).

No trabalho de Faith *et al.* (2014), foi demonstrado que a monocolonização de camundongos com 5 espécies bacterianas, *B. caccae*, *B. thetaotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. massiliensis* e *P. distasonis*, resultaram em potente indução de Tregs do cólon, embora o significado biológico desse aumento ainda precise ser demonstrado. A colonização com *B. caccae*, *B. thetaotaomicron*, *B. massiliensis* ou *P. distasonis* levou a aumentos de acetato, propionato e succinato em relação aos controles livres de germe, enquanto o butirato só foi significativamente elevado acima das concentrações observadas nos controles livres de germe no caso de camundongos colonizados por *P. distasonis*.

Em um estudo conduzido por Wang *et al.* (2019) o tratamento oral de camundongos com *P. distasonis* vivos reduziu o ganho de peso, melhorou a homeostase da glicose e corrigiu as anormalidades relacionadas à obesidade, incluindo hiperlipidemia e esteatose hepática, em camundongos obesos e obesos com síndrome metabólica, induzidos por dieta rica em gordura. Ainda foi verificado mudança importante no perfil dos ácidos biliares secundários pela melhora na conversão dos ácidos primários em secundários, além de elevar os níveis de succinato intestinal. A elevação de succinato se relacionou com a ativação de gliconeogênese intestinal que suprimiu a produção de glicose hepática, diminuindo a atividade de 6-Glicose-Pase, aumentando o conteúdo de glicose-6-fosfato no fígado, modulando a homeostase da glicose. Para conferir os efeitos o grupo ainda suplementou os camundongos obesos com succinato, demonstrando maior redução no ganho de peso corporal, ingestão alimentar acumulativa, os níveis de HbA1c (hemoglobina glicada) plasmática e insulina, bem como um aumento maior na sensibilidade à insulina. Os camundongos tratados ainda mostraram grande melhora na função de barreira intestinal, conforme indicado por uma redução na atividade da diamina oxidase (DAO) plasmática, níveis mais baixos de lipopolissacarídeo (LPS) no soro e expressão regulada positivamente de proteínas de junção apertada (Claudina-1 e ZO-1).

No trabalho realizado por Chávez-Carbajal *et al.* (2019) referem-se alta abundância desta espécie no grupo controle quando comparado aos grupos de mulheres obesas com e sem

síndrome metabólica. Também foi relacionada a atenuação de quadro em modelos experimentais murinos. Em uma breve revisão, a abundância de *P. distasonis* foi encontrada relativamente menor em pacientes com obesidade, fígado gorduroso não alcoólico e esclerose múltipla. No entanto, o mecanismo pelo qual *P. distasonis* interage com o hospedeiro permanece desconhecido.

5.4.4.4 *Bacteroides thetaiotaomicron*

Bacteroides thetaiotaomicron estão presentes em 90,58% das amostras e possui 1,45% da abundância média no microbioma amostrado por este trabalho. A abundância individual variou de 0% a 33,54%. No HMP a prevalência desta espécie foi de 46% (HMP, 2012). Em nosso estudo sua abundância relativa se apresentou significativamente reduzida em homens. Faz parte do Filo dos Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem Bacteroidales, Família Bacteroidaceae e Gênero *Bacteroides*.

É uma bactéria gram-negativa (WRZOSEK, 2013), sacarolítica, que possui grande importância no metabolismo intestinal, produtora de acetato, lactato, succinato e propionato (PORTER; LUIS; MARTENS, 2018). *B. thetaiotaomicron* possui um grande repertório de genes envolvidos na detecção e hidrólise de numerosos polissacarídeos derivados da dieta e do hospedeiro. *B. thetaiotaomicron* funciona como um forrageador com capacidade de se adaptar digerindo diversos glicanos dietéticos ou do hospedeiro, como a mucina, quando os glicanos dietéticos não estão disponíveis. Também possui múltiplas vias redundantes para combater as pressões imunológicas se adaptando muito bem ao sistema digestivo (GOODMAN *et al.*, 2009; WRZOSEK *et al.*, 2013).

Uma das questões importantes para sua sobrevivência é a necessidade de vitamina B12, pois não possui estas vias, precisando se aliar a produtores, como os Firmicutes (*Blautia obeum*) e Actinobacterias (GOODMAN *et al.*, 2009; HUTTENHOWER, 2012). Em nosso trabalho a espécie *Blautia obeum* obteve uma prevalência de 80% e uma abundância relativa de 0,13%.

B. thetaiotamicron tem a capacidade de liberar moléculas bioativas de até 10kDa que são capazes de interagir com a Via do NF- κ B exibindo atividade anti-inflamatória (KELLY *et al.*, 2003; QUEVRAIN *et al.*, 2015). Esta bactéria atenua a expressão de citocinas pró-inflamatórias ao promover a exportação nuclear da subunidade RelA do NF- κ B, por meio de uma via dependente de PPAR- γ . Este mecanismo destaca novos alvos celulares e abordagens para intervenção

terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias e também na infecção por bactérias patogênicas (KELLY *et al.*, 2003).

Wrzosek *et al.* (2013) inocularam em ratos livres de germes *B. thetaiotamicron*, que colonizou rapidamente e de forma estável o TGI. O pH luminal foi reduzido comparado ao controle livre de germes e houve produção de apenas acetato e propionato, mas não butirato. Houve aumento de células caliciformes e fatores de transcrição relacionados na diferenciação terminal destas células, produtoras de muco, na colonização por *B. thetaiotamicron* comparado ao controle. Ainda foram maiores os níveis de mRNA que codificam proteínas envolvidas na síntese e glicosilação de mucina, assim, *B. thetaiotaomicron* aparece para estimular a via de diferenciação das células caliciformes da linhagem secretora. A glicosilação das mucinas presentes no TGI nestes ratos monocolonizados se mostrou em menor proporção sulfatada e neutra e maior nos sialilados.

Em seguida foi observada a associação entre *B. thetaiotaomicron*, que produz acetato e *F. prausnitzii*, que metaboliza o acetato até butirato, portanto esta sinergia é considerada benéfica à saúde intestinal. A estabilização da colonização de *F. prausnitzii* exigiu repetidas inoculações nos ratos, diferentemente de *B. thetaiotamicron* que foi imediata e estável. O pH luminal em associação aumentou, quando comparado com a colonização com apenas *B. thetaiotamicron*. A implantação isolada de *F. prausnitzii* não foi bem-sucedida, sugerindo que *B. thetaiotamicron* “prepara” o TGI para receber bactérias mais sensíveis ao oxigênio. Esta associação reduziu o efeito anterior sobre a diferenciação das células caliciformes. A sulfatação das mucinas do TGI com a associação destas bactérias apresentou-se maior, semelhante aos ratos livres de germes (WRZOSEK *et al.*, 2013).

Outra associação que pode ser benéfica é a que acontece entre *B. thetaiotaomicron* e *P. copri*, pois a primeira não possui genes de enzimas para degradação de polissacarídeos complexos, já a segunda possui enzimas e cluster de genes essenciais para fermentação e utilização destes. E a co-colonização simultânea pode ser benéfica em relação à tolerância à glicose pela capacidade de *P. copri* metabolizar fibras da dieta (KOVATCHEVA-DATCHARY *et al.*, 2015).

B. thetaiotaomicron pode exigir altos níveis de expressão de mucinas sialiladas para fixação e colonização do TGI. De fato, *B. thetaiotaomicron* pode expressar adesinas que reconhecem especificamente e se ligam a resíduos de ácido siálico e também podem usar resíduos de ácido siálico como substratos hospedeiros. *B. thetaiotaomicron* possui 28 sulfatases previstas e apenas 1

enzima anaeróbica maturadora de sulfatase predita que permite que as bactérias se adaptem e se alimentem de glicanos sulfatados do hospedeiro como nutrientes. Presumivelmente, *B. thetaiotaomicron* usa esses resíduos de sulfato rapidamente, não apenas como fontes de nutrientes, mas também para obter acesso a outros monossacarídeos, como N-acetilglucosamina (GlcNAc) e galactose (Gal), os dois monossacarídeos substituídos por resíduos de sulfato em O-glicanos de mucina (BENJDIA *et al.*, 2011)

No trabalho de Leonard *et al.* (2020) uma associação entre a exposição a antibióticos (como um fator de risco ambiental) e uma maior abundância de *Bacteroides thetaiotaomicron* foi encontrada aos 4-6 meses de idade.

5.4.4.5 *Faecalibacterium prausnitzii*

Faecalibacterium prausnitzii está presente em 97,76% dos indivíduos amostrados no presente trabalho e possui 5,87% de prevalência média no total das amostras, e obteve variação de abundância de 0% a 14,66% individualmente, sendo assim esta espécie de bactéria intestinal se mostra de grande importância no trabalho realizado. A abundância relativa desta espécie apresentou aumento significativo em homens, quando comparados com as mulheres. Faz parte do Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem dos Clostridiales, na Família dos Ruminococcaceae e Gênero *Faecalibacterium*.

Anteriormente denominada *Fusobacterium prausnitzii*, mas que em 2002 foi reclassificada, é uma bactéria anaeróbia extremamente sensível ao oxigênio (DUNCAN *et al.*, 2002) que coloniza principalmente na porção ileocecal e íleo terminal do intestino (ZHOU, 2021). Possui a capacidade de produzir putrecina a partir da via da arginina, mas é provável que em uma coorte saudável estes metabólitos sejam utilizados pela própria bactéria para seu benefício (KAUR *et al.*, 2017).

Apontada como uma das bactérias mais abundantes encontradas no intestino humano, o que condiz com o encontrado neste trabalho, tem apresentado papel protetor na saúde intestinal (LOPEZ-SILES *et al.*, 2017; MARTIN *et al.*, 2017) e possui atividade anti-inflamatória (CLAESSON *et al.*, 2010; TONG *et al.*, 2018). Sua abundância média em indivíduos saudáveis é em torno de 5%. Redução na abundância de *F. prausnitzii* tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças como DII, SII, câncer colo-retal, obesidade e doença celíaca (MARTIN *et al.*, 2017),

diabetes tipo 2 (TONG *et al.*, 2018), casos mais graves de doença de Crohn (SOKOL, 2009), quadro asma desencadeada por alergia em crianças (DEMIRCI *et al.*, 2019), casos de esclerose múltipla (HOOGEN; LAMAN; HART, 2017), infecções por *Clostridium difficile* e vírus como Hepatite B, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e COVID-19 (HE; ZHAO; LI, 2021). Portanto sua presença tem sido relacionada a um papel de proteção intestinal contra estas doenças (SOKOL *et al.*, 2008; QUEVRAIN *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2021), melhora nos quadros de inflamação de baixo grau relacionados à obesidade e aos pacientes diabéticos que realizaram cirurgia bariátrica por Y de Roux (TONG *et al.*, 2018), efeitos protetores e terapêuticos em casos de estresse, ansiedade e depressão em animais (HAO *et al.*, 2019), além de melhorar a barreira intestinal por aumentar a expressão de ocludina e e-caderina, reduzindo a translocação gastrointestinal de microorganismos, principalmente em casos de COVID-19 e reduzir a sensibilidade visceral (HE; ZHAO; LI, 2021). Os estudos são contraditórios em relação ao papel da espécie *Faecalibacterium prausnitzii* quanto à proteção ou em contribuição ao desenvolvimento da obesidade (CHOI *et al.*, 2018). Em comparação com o grupo de controle magro, as pessoas obesas apresentaram maior contagem de *Faecalibacterium prausnitzii*, que foi considerada a produção de mais butirato, um substrato energético essencial para o metabolismo do epitélio intestinal, e a superprodução de butirato poderia causar inflamação intestinal em diferentes graus (HIPPE *et al.*, 2016).

De acordo com o estudo de revisão realizado por Nikolova *et al.* (2021), o gênero *Faecalibacterium* e *Coprococcus* se apresentaram reduzidos em casos de depressão, transtorno bipolar, psicose e esquizofrenia. *Faecalibacterium* foi inversamente associado à gravidade da depressão, transtorno bipolar e anorexia nervosa, sugerindo que a depleção desse gênero pode ser característica do estado depressivo, independentemente do diagnóstico.

O papel protetor da mucosa é compartilhado por bactérias do grupo *Clostridium leptum* (*Clostridium* cluster IV) dentro do Filo dos *Firmicutes*, do qual a *F. prausnitzii* faz parte junto com *Roseburia* (DUNCAN *et al.*, 2002; SOKOL *et al.*, 2009). Ambas são produtoras de butirato (TONG *et al.*, 2018). *F. prausnitzii* auxilia na manutenção de vários tipos de células de linhagens secretórias no intestino através da via do muco e formação de O-glicano (HE; ZHAO, LI, 2021). *F. prausnitzii* e, em maior extensão, o grupo *C. leptum*, chegam ao TGI tardiamente após o nascimento, provavelmente porque são sensíveis ao oxigênio. Além disso, após a ressecção intestinal, rompendo a estrutura intestinal e expondo o cólon ao oxigênio, o grupo *C. leptum* desaparece da microbiota (JOLY *et al.*, 2010).

Estudos têm mostrado que a presença de *F. prausnitzii* e seu sobrenadante preveniram o dano fisiológico ao intestino induzido em camundongos, o que possivelmente ocorreu através da produção de butirato, ácidos salicílicos ou moléculas anti-inflamatórias (TONG, *et al.*, 2018).

De acordo com os estudos de Quevrain *et al.* (2015), *Faecalibacterium prausnitzii* expressa uma proteína de 15 kDa denominada MAM. Esta proteína ou seus peptídeos derivados são capazes de bloquear a ativação de NF- κ B induzida por Carma-1 ou LPS de uma forma dependente de dose, reduzindo a inflamação intestinal. Além da produção de MAM, é também uma das principais produtoras de butirato intestinal, ácido graxo de cadeia curta que nutre os colonócitos e está relacionado à redução da inflamação intestinal através da inibição do fator de transcrição NF- κ B, e regulação positiva do PPAR-gama, e inibição do interferon gama (IFN-gama). Outra propriedade anti-inflamatória atribuída à *F. prausnitzii* é a capacidade de induzir no hospedeiro à produção de citocinas tolerogênicas, como a redução da secreção de IL-1 β , IL-8, IL-12 e INF-gama, e uma elevação de citocina anti-inflamatória IL-10 (SOKOL *et al.*, 2009; LOPEZ-SILES *et al.*, 2016; HE; ZHAO; LI, 2021). O sobrenadante pode exercer efeitos protetores inibindo a diferenciação Th17 e a secreção de IL-17^a em colite. E manter a regulação positiva em células T reguladoras. A produção de butirato pode manter o equilíbrio entre Th17/Treg (ZHOU *et al.*, 2021).

Algumas cepas de *F. prausnitzii* têm sido estudadas para uso potencial como probióticos de próxima geração, como a cepa de referência A2-165 e a formadora de biofilme HTF-F (MARTIN *et al.*, 2017; HE; ZHAO; LI, 2021). São de difícil cultura, mesmo em ambiente anaeróbico e a riblofavina, cisteína e glutatona auxiliam no seu crescimento. Como fonte de energia podem utilizar frutose, oligofrutose, amido e inulina, mas não arabinose, melibiose, rafinose, ramnose, ribose e xilose. O ácido acético pode estimular seu crescimento e produzir CO₂, mas não H₂. Os principais produtos de fermentação de glicose e acetato são D-lactato e butirato (DUNCAN *et al.*, 2002). Ao metabolizar o acetato também produz ácidos salicílicos (MIQUEL *et al.*, 2015).

No ambiente fisiológico do cólon intestinal, questões como pH, concentração de O₂ e colato alteram a proporção de *F. prausnitzii*, e a dieta inadequada e o fumo levam à redução da abundância (HE; ZHAO; LI, 2021). Observou-se uma associação benéfica entre *F. prausnitzii* e *Bacteroides thetaiotaomicron* aumentando a sua produção de ácido butírico, revelando uma alimentação cruzada (WRZOSEK *et al.*, 2013). Alguns estudos indicam que pode ser necessária a presença de *E. coli* e *B. thetaiotaomicron* para uma adequada colonização por *F. prausnitzii* (HE; ZHAO; LI, 2021).

Em nosso estudo não identificamos esta relação entre as espécies de *F. prausnitzii*, *E. coli* e *B. thetaiotaomicron*, havendo em muitos casos a ausência de ambas e o estabelecimento de *F. prausnitzii* em altos valores de abundância, e o contrário também foi verdadeiro, demonstrando que a relação entre estas espécies e o TGI são ainda mais complexas, havendo fatores não considerados nesta associação descrita anteriormente. Também deve ser considerado que o TGI estudado por este trabalho foi de indivíduos adultos que possuem uma estrutura de microbioma madura, ao contrário dos estudos que verificaram a necessidade da relação acima descrita, onde foram utilizados modelos livres de germes.

Em trabalho realizado por Zhou *et al.* (2021) o tratamento com *F. prausnitzii* e seu sobrenadante aumentou a diversidade da microbiota intestinal, especialmente no grupo sobrenadante, além de aumentar o conteúdo de SCFAs nas fezes, indicando que podem estimular ao aumento de bactérias produtoras de SCFAs. Aumentou a abundância de *Firmicutes*, *Cyanobacteria* e *Clostridiales*, e diminuiu a abundância de *Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Bacteroidetes*. No nível do gênero, *F. prausnitzii* aumentou a abundância de *Butyricoccus*, *Roseburia*, *Ruminiclostridium*, *Lachnospiraceae*, *Oscillibacter*, *Anaerotruncus*, *Ruminococcaceae*, *Alistipes*, *Rikenella*, *Allspiophore*, *Deisulfoprecotella* e *Mucispiritzum*. Notavelmente, os *Butyricoccus*, *Roseburia*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Rikenella* e *Eubacterium xylanophilum* que são bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA).

A modulação intestinal dos níveis de *F. prausnitzii* é possível através de abordagens dietéticas, transplante da microbiota fecal e do cultivo *in vitro* (HE; ZHAO; LI, 2021).

5.4.5 Espécies mais abundantes em toda a amostra

5.4.5.1 *Prevotella copri*

A bactéria mais abundante na média geral do microbioma intestinal amostrado por este trabalho, com 13,75% da abundância total, mas não se mostrou dentre as de alta prevalência, alcançando 50,6% das amostras. Em nosso estudo a abundância relativa se apresentou significativamente aumentada em homens e aumentou com o elevar do IMC. É bactéria Gram-negativa que faz parte do Filo Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem Bacteroidales, Família Prevotellaceae e Gênero *Prevotella*.

Como abordado anteriormente neste trabalho, a maior abundância do gênero *Prevotella* tem sido relacionada com populações que compartilham características de caçadores, coletores ou rurais, que possuem alimentação mais rica em fibras e com baixo teor de gordura, relacionada à capacidade deste gênero em obter energia a partir da metabolização de fibras e também a capacidade de produção de acetato, propionato, formato, succinato a partir das fibras. Quanto maior o grau de urbanização menor a abundância relativa deste gênero (WIBOWO, 2021; VANGAY, 2018; SONNENBURG; SONNENBURG, 2019; PRECUP; VODNAR, 2019; OLIPHAN, 2019). No estudo de Vieira-Silva *et al.* (2016) a espécie *Prevotella copri* foi relacionada à metabolização de sacarídeos, mas também de proteínas.

Nível mais alto de abundância de *Prevotella* tem sido associado à elevação do IMC, resistência à insulina, hipertensão e doença hepática gordurosa não alcoólica (PEDERSEN *et al.*, 2016; PRECUP; VODNAR, 2019), concordando com o que observamos em nosso trabalho, onde a elevação do IMC está diretamente relacionada com a elevação do gênero *Prevotella*, com o aumento da espécie *Prevotella copri*.

Pedersen *et al.* (2016) em seus estudos com indivíduos adultos não diabéticos dinamarqueses, *Prevotella copri* e *Bacteroides vulgatus* se relacionaram com elevação da produção de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), principalmente pela correlação com via da d-citramalato sintase, mas não o seu transporte interno para as bactérias, podendo contribuir com o quadro de resistência à insulina (RI), sugerindo que uma razão aumentada entre a biossíntese microbiana intestinal e a redução da captação de BCAAs pelas bactérias contribui para concentrações elevadas de BCAA séricos, que são conhecidos por se associarem com RI e diabetes tipo 2. Não houve relação com o funcionamento das células beta pancreáticas. O metaboloma associado a RI se associa a componentes funcionais do microbioma intestinal: o potencial aumentado para biossíntese de lipopolissacarídeo e BCAA, além de potencial reduzido para transporte de BCAA em células bacterianas, metanogênese e oxidação de piruvato. Além deste metabólito se relacionou de forma significativa a esta espécie a produção de triptofano e LPS.

Neste mesmo estudo, Pedersen *et al.* (2016) trataram dois grupos de camundongos machos, um colonizado com *P. copri* e outro não, com uma dieta rica em gordura. Após 2 semanas no grupo colonizado, a intolerância à glicose agravou-se e aumentaram os níveis de BCAA séricos totais. Após 3 semanas a sensibilidade à insulina foi reduzida, sugerindo um papel causal entre *P. copri* na mediação do aumento de BCAA e RI.

No estudo de Zeybel *et al.* (2021) com humanos em diversos níveis de esteatose hepática (sem esteatose até esteatose severa), *P. copri* apresentou um comportamento associado negativamente ao metabolismo das estruturas lipídicas dos ácidos biliares, mas positivamente relacionado com os aminoácidos (gama-glutamil-alfa-lisina, S-adenosil-homocisteína, gama-glutamil treonina e treonina), concordando com os estudos anteriores. Entretanto a abundância de *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium eligens*, *Parabacteroides distasonis*, *Roseburia faecis*, *Butyrivibrio crossotus* e *Prevotella copri* foram negativamente correlacionadas com os níveis plasmáticos de proteínas relacionadas à inflamação.

Sendo assim, o efeito de *P. copri* pode estar relacionado diretamente com a dieta, pois no estudo de Kovatcheva-Datchary *et al.* (2015), com humanos adultos não diabéticos, o consumo alimentar de pão de grãos de cevada, rico em fibras e amido resistente, promoveu maiores níveis de melhora na glicemia e insulina pós-prandiais do que no grupo que consumiu pão de farinha de trigo. Ainda dentro do grupo dos que consumiram pão de grãos de cevada houve os não respondedores e os melhores respondedores para a melhor sensibilidade na glicose e insulina pós-prandial. Foi identificado que nos melhores respondedores houve aumento dos *Bacteroidetes*, principalmente no gênero *Prevotella* com *P. copri* como a espécie mais abundante. A relação *Prevotella/Bacteroides* aumentou na intervenção com pão de grãos de cevada, assim como a expressão gênica dos genes codificadores de enzimas degradadoras de fibras (xilosidades, glucosidades, liqueninase e celulase). *Prevotella* pode interagir positivamente com os outros membros da comunidade para promover o aumento da fermentação de carboidratos nos respondentes, co-ocorrendo com muitas espécies do mesmo gênero e de outros filos (*Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Archea*), expandindo o nicho.

Quando comparado com bactérias comensais estritas, *Prevotella* exibe propriedades inflamatórias aumentadas, conforme demonstrado pela liberação aumentada de mediadores inflamatórios de células do sistema imunológico e várias células do estroma. *Prevotella* estimula a liberação de interleucina-1 beta (IL-1b), IL-6 e IL-23 pelas células dendríticas (DC), que, por sua vez, medeiam a produção de IL-17 pelas células T helper 17 (Th17) que ativam os neutrófilos. As DCs também produzem IL-12, que medeia a ativação de células Th1 e T citotóxicas (Tc). As células epiteliais podem contribuir para o recrutamento de células T positivas para CCR5 por meio da produção de CCL5. A infecção por HIV e a exposição a *Prevotella* são fatores de risco para disbiose rica em *Prevotella* no intestino. A disbiose leva à liberação sistêmica de inflamação,

bactérias, lipopolissacarídeos (endotoxemia) e agonistas do receptor Toll-like 9 (TLR9), que por sua vez medeiam a expressão da doença sistêmica, incluindo inflamação do fígado, resistência à insulina, ganho de peso e aumento da pressão arterial (PA). O aumento associado à disbiose nas respostas imunes Th17 pode afetar o aparecimento de artrite reumatoide (NORA). A disbiose aumenta a inflamação mediada por Th1 na colite experimental induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) (LARSEN, J., 2017).

Esses achados indicam que algumas cepas de *Prevotella* podem ser patobiontes clinicamente importantes que podem participar de doenças humanas promovendo inflamação crônica. *P. copri* foi relacionada a pacientes com artrite reumatoide (NORA) e que sua ação inflamatória está relacionada à indução de resposta imune Th1 (T helper tipo 1) (SCHER *et al.*, 2013; GOMEZ; LUCKEY; TANEJA, 2015; LARSEN, J., 2017; ALPIZAR-RODRIGUEZ *et al.*, 2019).

5.4.5.2 *Alistipes putredinis*

A abundância média geral de *Alistipes putredinis* no presente trabalho foi de 5,68%, com prevalência de 76,5% das amostras analisadas. De forma individual foi de 0 a 16,8% de abundância nas amostras. Em nosso estudo apresentou abundância significativamente aumentada em mulheres quando comparada aos homens. Faz parte do Filo dos Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem dos Bacteroidales, Família Rikenellaceae, Gênero *Alistipes*. O gênero *Alistipes* é comumente encontrado no TGI humano e animal onde se acredita que tenha relações simbióticas com o hospedeiro (PARKER *et al.*, 2020).

Rautio *et al.* (2003) em seus estudos sugeriram um novo gênero bacteriano a partir da descoberta de uma bactéria que apresentou alta similaridade com *Bacteroides putredinis*. A partir destes estudos surgiu o gênero *Alistipes* com a reclassificação de *B. putredinis* em *Alistipes putredinis*. Já foi isolada de fezes, abscessos abdominais e retais, de casos de apendicite aguda, de podridão do pé em ovelhas, solo de fazenda e raramente da boca humana.

É bactéria gram-negativa, em forma de bastonetes retas ou ligeiramente curvadas, com extremidades arredondadas, não formadora de esporos, estritamente anaeróbia. Formadoras de grande quantidade de ácido succínico, com menor formação de ácido acético, isovalérico e propiônico, e em quantidades bem reduzidas ácido láctico, isobutírico e butírico. Grande produtora

de gás H₂. Não formadora de nitrito (RAUTIO *et al.*, 2003). Não é produtora de pigmento e não é resistente à bile, é catalase positiva, nitrato redutase e urease negativas. Não é fermentativa (concentração de 20%) (PARKER *et al.*, 2020).

No estudo realizado por Vieira-Silva *et al.* (2016) esta espécie de bactéria demonstrou possuir genoma predominante na metabolização de proteínas.

Em indivíduos com e sem carcinoma colo-retal, Kaur, Das e Mande (2017), também observaram que o gênero *Alistipes* apresentava diversas vias de putrefação de aminoácidos, como as vias de produções de tetrahydrofolato (degradação de histidina), indol (degradação de triptofano) e fenol (degradação de tirosina), mas este gênero estava mais abundante na coorte saudável do que na coorte carcinoma colo-retal. Embora geralmente considerado como um comensal, tem sido implicado em inflamação e bacteremia em pacientes com distúrbios gastrointestinais, assim, as vias de putrefação identificadas em *Alistipes* podem contribuir em consequências deletérias em condições disbióticas.

Alistipes também foi isolado da corrente sanguínea, bem como abscessos apendiculares, abdominais, perirretais e cerebrais, destacando seu potencial papel patogênico oportunista em doenças humanas. Foi encontrado em outros fluidos corporais, nomeadamente na urina e no fluido peritoneal. Tem sido implicado na fibrose hepática, câncer colorretal, doenças cardiovasculares e transtornos do humor, entre outras doenças potenciais. É razoável supor que diferentes espécies de *Alistipes* podem ter diferentes papéis na nutrição e saúde, dependendo do hospedeiro e do sistema corporal influenciado (PARKER *et al.*, 2020).

A. putredinis foi observado aumentar com a ingestão de vegetais crucíferos (brócolis cozido, repolho verde cru, repolho roxo cru, brotos de rabanete cru, couve-flor cozido) durante 14 dias em humanos, ficando evidente que esta espécie é capaz de metabolizar fibras e glucosinolatos possuindo enzima semelhante à mirosinase (LI *et al.*, 2009).

Em indivíduos com inflamação ligada à cirrose hepática houve redução de *A. putredinis* quando a condição passou de compensado para descompensado, exercendo um potencial de ação “protetor” (SHAO *et al.*, 2018).

5.4.5.3 *Bacteroides dorei*

A abundância média geral de *Bacteroides dorei* em nosso trabalho foi de 4,33%, atingindo a prevalência de 70,6% das amostras analisadas. De forma individual a abundância variou de 0 a 84,7%, sendo este valor extremo em apenas um dos indivíduos que apresentou a menor diversidade bacteriana de toda amostra, apresentando um super-crescimento desta espécie. Em nosso estudo a abundância relativa se apresentou significativamente reduzida em homens. Esta bactéria faz parte do Filo dos Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem Bacteroidales, Família Bacteroidaceae e Gênero *Bacteroides*.

Isolado, inicialmente, de um homem japonês saudável, recebeu este nome em homenagem ao microbiologista francês Joël Doré, devido às suas contribuições para a microbiologia intestinal. As células são bastonetes anaeróbios Gram-negativos, não formadores de esporos, não móveis, crescem na presença de bile. Não produtor de indol e aesculina não é hidrolisada, não redutora de nitrato. Degradadora de ácidos a partir glicose, sacarose, xilose, ramnose, lactose, maltose, arabinose, manose e rafinose. Apresenta a atividade de beta-galactosidase (BAKIR *et al.*, 2006). *B. dorei* e *B. vulgatus* são muito similares, diferindo pela presença de beta-galactosidase (DAVIS-RICHARDSON *et al.*, 2014), como descrito acima.

Alguns desfechos de saúde e doença são compartilhados entre *B. dorei* e *B. vulgatus*, como já descrito anteriormente em *B. vulgatus*, como no caso de diabetes tipo 1 e doença arterial coronariana.

Em um grande estudo de coorte finlandesa em crianças com alto risco para diabetes tipo 1 (DM1) autoimune, identificada pelo genótipo HLA-DQB1, apoiam a associação de uma única espécie de bactéria, *Bacteroides dorei*, no desenvolvimento de autoimunidade. A causa do aumento na abundância de *B. dorei* ainda não foi descrita, mas já se sabe que se eleva após a introdução alimentar, principalmente por sua capacidade de digestão de carboidratos complexos. Também não se sabe se ela participa da fisiopatologia da autoimunidade no DM1. Algumas possibilidades levantadas são a ruptura da camada epitelial e/ou a manipulação do desenvolvimento do sistema imunológico. Mesmo que *B. dorei* não seja a causa desta autoimunidade, a sua abundância no intestino pode ser útil como um diagnóstico em grupos de alto risco mesmo antes do aparecimento do autoanticorpo (DAVIS-RICHARDSON *et al.*, 2014).

No estudo de Leonard *et al.* (2014), foi verificada a metilação do DNA de *B. dorei* de duas crianças com alto risco para DM1 autoimune que foram acompanhadas desde o nascimento. Uma das crianças desenvolveu DM1 autoimune, já a outra não. Quando comparadas as diferenças,

viu-se que a diferença entre ambas era o grau de metilação do DNA causada pela ausência de um gene em um dos indivíduos. É sugerido que mais estudos sejam realizados neste sentido.

Em um caso descritivo, Matsuoka *et al.* (2021) descreveram que um paciente do sexo masculino de 78 anos, com diagnóstico de aneurisma micótico na aorta torácica, usando antibióticos, apresentou piora do quadro. Foi realizada cirurgia e a cultura do tecido retirado indicou a presença de *B. dorei*. Após tratamento com antibióticos específicos, o paciente apresentou melhora do quadro, sem recorrência.

5.4.5.4 *Bacteroides stercoris*

Bacteroides stercoris esteve presente em 65,88% das amostras e possui 3,53% da abundância média no microbioma amostrado por este trabalho. A abundância individual variou de 0% a 32,49%. Faz parte do Filo dos Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem Bacteroidales, Família Bacteroidaceae e Gênero *Bacteroides*.

É uma bactéria sacarolítica produtora de succinato e acetato, com quantidades moderadas de formato e propionato, com vestígios de isobutirato e isovalerato. O piruvato é convertido em acetato. Não foi detectado H₂. Capaz de metabolizar inulina, amido e rhamnose, estes em pH menor que 5.5, anaeróbica gram-negativa que cresce em 20% de bile isolada de fezes humanas descrita pela primeira vez por Johnson, Moore; Moore (1986).

A heparinase III de *B. stercoris* HJ-15 têm sido clonada e utilizada para fins específicos na degradação de heparina e glicoaminoglicanos (HYUN; LEE; KIM, 2010).

No estudo de Wang *et al.* (2018), *B. stercoris* foi encontrada enriquecida nos controles saudáveis, quando comparado com os casos de asma.

Brown *et al.* (2021) realizaram uma breve revisão sobre a função das ADP-ribosiltransferases (ADPRTs), que são uma classe de enzimas presentes em eucariotos e procariotos que convertem nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) em nicotinamida e ADP-ribose (ADPr), que é transferida para proteínas, ácidos nucleicos ou pequenas moléculas, e modulam diversos processos celulares, incluindo reparo de DNA, função mitocondrial e imunidade inata. O principal foco de estudo dos ADPRTs tem sido em patógenos como toxinas, mas em seu trabalho os pesquisadores identificaram que os ADPRTs estão presentes, secretados e enzimaticamente ativos em isolados comensais, que abrangem a maioria dos táxons procariotos,

conhecidos por colonizar o intestino. Caracterizaram Bxa, uma ADPTRs presente em Bacteroides que possibilita a adesão à mucosa e que está presente em *B. stercoris*, conferindo uma vantagem competitiva. Os ácidos biliares conjugados aumentam a secreção de Bxa e sua transcrição está relacionada ao tempo de exposição a estes ácidos, atingindo o pico após 120 minutos. Maior expressão foi relacionada ao estresse oxidativo. Estes achados sugerem que a toxigenicidade dos ADPRTs patogênicos pode ser a exceção, e não a regra no intestino

5.4.5.5 *Eubacterium sp CAG:180*

Eubacterium sp CAG:180 apresentou abundância média geral de 2,02%, com prevalência de 28,23% das amostras deste estudo. Individualmente a abundância variou de 0 a 27% nas amostras. Faz parte do Filo dos Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales, Família Eubacteriaceae, Gênero *Eubacterium*.

No estudo de Sun *et al.* (2020) com tripulantes de navio comercial, *E. sp CAG180* foi enriquecida nos indivíduos que apresentaram a Síndrome do Oceano (OGS), cujas características são bem específicas dos trabalhadores desta área, relacionados à privação de sono, convívio social e alimentação.

No estudo de Zeybel *et al.* (2021) as abundâncias das espécies pertencem a Clostridiales, como *E. sp CAG 180* e *F. prausnitzii*. Apresentaram-se relacionadas aos metabólitos primários de ácidos biliares, bem como os numerosos peptídeos e aminoácidos relacionados à esteatose hepática (gama-glutamil-alfa-lisina, S-adenosil-homocisteína, gama-glutamil treonina e treonina). A abundância intestinal de *E. sp CAG 180* foi associada positivamente aos níveis plasmáticos de proteínas inflamatórias.

Observa-se poucos estudos sobre esta espécie bacteriana e considerando a sua distribuição entre as amostras deste trabalho, provavelmente a alta abundância em algumas amostras aumentou a abundância média geral, o que fez esta espécie classificar-se entre as mais abundantes desta amostra.

5.4.5.6 *Eubacterium rectale*

Eubacterium rectale apresentou abundância média geral de 1,87%, com prevalência de 80% das amostras deste estudo. Individualmente a abundância variou de 0 a 15,33% nas amostras. Faz parte do Filo dos Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales, Família Eubacteriaceae, Gênero *Eubacterium*.

E. rectale é um dos principais grupos da microbiota intestinal humana, e é encontrada em quase todos os adultos, independente de origem e condições de estilo de vida, como urbanização, saneamento e dietas (MAUKONEN *et al.*, 2006; KARCHER *et al.*, 2020). Foi descrita como uma bactéria pertencente ao microbioma central saudável (TAP *et al.*, 2009).

Constituem-se de células bastonetes uniformes, não formadores de esporos, com membrana Gram-positiva, obrigatoriamente anaeróbicas, móveis monoflageladas ou não móveis. São sacarolíticos e os principais produtos de fermentação, em meio PYG, são butirato, acetato, hidrogênio e lactato, mas não propionato e succinato como produtos principais. O peptidoglicano em todas as espécies é do tipo A1c (ROSETO *et al.*, 2016). A maioria produz gás hidrogênio (DUNCAN; FLINT, 2016). Possui em sua superfície celular a amilase (Amy13K) que faz a digestão do amido, principalmente amido de milho, mesmo com alto teor de amilose, mas possui uma fraca ligação ao amido de batata, não crescendo em amido de batata resistente (COCKBURN *et al.*, 2018)

O gênero *Eubacterium* foi descrito como portador de bactérias produtoras de butirato, assim como em *Roseburia* e *Clostridium* (Cluster I, IV, XIVa, XV, XVI) (PRYDE *et al.*, 2002). Em seu artigo questionando a classificação de *Eubacterium rectale*, Rosero *et al.* (2016) relatam que o grupo funcional dos produtores de butirato é filogeneticamente incoerente com a maioria dos produtores pertencentes ao grupamento Clostrium XIVa e ao IV. Sendo assim propuseram um novo gênero e um novo nome para a espécie: *Agathobacter rectalis*. Em seguida alguns pesquisadores refutaram esta ideia solicitando mais comparações com a sequência completa do genoma desta espécie (SHERIDAN *et al.*, 2016).

Karcher *et al.* (2020) realizaram a montagem do genoma de *E. rectale* a partir de 1300 genomas extraídos de mais de 6500 conjuntos metagenômicos intestinais populacionais, usando binning baseado em referência. A análise filogenética confirmou o enquadramento de *E. rectale* em grupos discretos que suportou a existência de quatro subespécies. Três destas são subárvores filogenéticas grandes e bem-definidas, que foram denominadas de ErEurasia, ErEurope, ErAsia, pois as cepas eram predominantes destas áreas. Já a quarta subespécie denominada ErAfrica não

havia sido observada anteriormente. Estes dados fortalecem a noção de associação geográfica de algumas cepas. A divergência genética confirmou que as diferentes cepas devem ser consideradas da mesma espécie já que a dissimilaridade genética pareada está abaixo de 5% (nenhum par atingiu 3%). As subespécies possuem diferenças dentro e entre cada subespécie. A subespécie ErEurope apresentaram maior CAZy enriquecidos para carboidratos, visando hemiceluloses e pectinas, crescendo melhor com xialana e inulina e pior com sacarose. Também apresentaram famílias de genes de glicosiltransferases que estão associados à formação de biofilme, glicosilação de proteínas ou síntese de polissacarídeos da parede celular, o que pode ser vantajoso já que esta subespécie é imóvel, e as demais são móveis. As cepas de ErAfrica se originaram de indivíduos que vivem em um estilo de vida tradicional, e semelhante a *P. copri*. *E. rectale*, só foi encontrada em humanos e nunca em primatas não humanos selvagens.

Na revisão inicial realizada por Cockburn *et al.* (2018), relacionaram informações de outros estudos que apontam a redução da abundância de *E. rectale* em algumas condições de doença, como obesidade, doença inflamatória intestinal, diabetes e fibrose cística. No estudo de Zeybel *et al.* (2021) apresentou-se reduzido nos indivíduos com esteatose hepática leve, quando comparado com os controles sem esteatose. Neste mesmo estudo foi encontrado que existe uma correlação negativa entre a presença de *Actinomyces sp ICM47* na boca com *E. rectale* e *Roseburia faeces* intestinal relacionado ao desfecho de doença hepática gordurosa não alcoólica.

No estudo de Wang *et al.* (2021) com a identificação do perfil do microbioma intestinal associado ao câncer cólon-retal e bactérias “condutoras” potenciais, realizaram o sequenciamento do gene 16S rRNA da mucosa intestinal de amostras pareadas de tumor e mucosas adjacentes ao tumor, locais fora do tumor e controles saudáveis. O microbioma intestinal das mucosas tumorais, mas não o das mucosas adjacentes ao tumor e do controle saudável, mostra menor diversidade alfa e taxa bacteriana distinta em comparação com os locais fora do tumor. Na localização do tumor há maior abundância de *Fusobacterium nucleatum* que se mostra inexistente em amostra de pessoas saudáveis, sendo considerada como uma bactéria “passageira”. A abundância relativa de Eubacteriaceae é maior em locais fora do tumor do que em mucosas tumorais. Usando *Eubacterium rectale* e *F. nucleatum* como exemplo, foi demonstrado *in vivo* que nenhuma induziu colite isoladamente. Apenas após a indução com sulfato de dextrano de sódio (DSS) *E. rectale* aumentou o quadro de colite induzida, mas não *F. nucleatum*. Nos estudos *in vitro* foi demonstrado o efeito indutor de resposta inflamatória através de ativação de NFkB do LPS de *E. rectale* em células

normais do epitélio do cólon. Entretanto, a relação entre *E. rectale* e doença inflamatória intestinal ainda é desconhecida.

5.4.5.7 *Bacteroides fragilis*

Bacteroides fragilis representou 1,73% da abundância relativa total no geral da amostra analisada, sendo prevalente em 38,83% das amostras. De forma individual atingiu de 0 a 45,95% da abundância. Em nosso trabalho a abundância de *B. fragilis* se apresentou menor em homens do que em mulheres, além de reduzir com o aumento do IMC. É uma bactéria gram-negativa que faz parte do Filo dos Bacteroidetes, Classe Bacteroidia, Ordem dos Bacteroidales, Família Bacteroidaceae e do Gênero *Bacteroides*.

Nas amostras de fezes de HMP este táxon foi transportado a um nível de pelo menos 0,1% em 16% das amostras (mais de 1 % abundância em 3%) (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

Está apresentado na literatura que as bactérias imunomodulatórias precisam estar próximas da superfície epitelial para interagir com o hospedeiro e que *B. fragilis* está associado ao epitélio intestinal (SURANA; KASPER, 2014) podendo ser por este motivo os menores níveis de abundância encontrados na amostra de fezes, devido a sua localização no TGI e o nosso modelo de estudo ter sido amostras de fezes.

Existe uma associação próxima entre *B. fragilis* e *B. thetaiotaomicron*. *B. fragilis* é uma bactéria Gram-negativa que possui uma cápsula de polissacarídeos complexos (CPC) que possui pelo menos oito polissacarídeos estruturalmente únicos, sendo que os polissacarídeos A e B possuem carga positiva e negativa alternada (MAZMANIAN; KASPER, 2006).

É considerada bactéria simbiótica, sendo que a monocolonização por *B. fragilis* foi suficiente para estimular o desenvolvimento precoce do GALT, induzindo a organogênese normal do baço e timo e o desenvolvimento imunológico equilibrado em modelos animais livres de germes (MAZMANIAN *et al.*, 2005). Possui um polissacarídeo zwitteriônico (ZPS) que ativa diretamente as células T CD4 + induzindo a expressão de IL-10 e pode corrigir certos defeitos imunológicos em animais livres de germes, como a proporção reduzida de células T CD4 + na população de linfócitos esplênicos e a produção desregulada de citocinas sistêmicas que são encontradas na ausência de colonização bacteriana, além de um potencial fator protetor para casos de doença inflamatória intestinal e asma (MAZMANIAN; KASPER, 2006).

B. fragilis possui um polissacarídeo capsular A (PSA) que tem peso molecular de 110kDa capaz de se associar a moléculas de MHC-II das células dendríticas, macrófagos e células B do hospedeiro com alta afinidade por meio de um mecanismo de espelhamento de apresentação de antígeno MHC-II sendo reconhecidas pelas células T durante infecções bacterianas (A COBB; KASPER, 2008), além de elevar a expressão de CD80, CD86 e CD40L (MAZMANIAN; KASPER, 2006). Além do PSA, *B. fragilis* também produz glicoesfingolípídeos que reduzem células T assassinas naturais invariantes (iNKT) na lâmina própria do cólon e que esse efeito leva a melhores resultados em um modelo de colite murina (SURANA; KASPER, 2014).

No estudo de Ochoa-Repáraz *et al.* (2010) com modelo animal para esclerose múltipla humana, a encefalomielite autoimune experimental (EAE), o uso de *B. fragilis* como probiótico via oral preveniu a desmielinização no desenvolvimento de esclerose devido à presença de PSA, que desencadeou maiores taxas de conversão em células Foxp3⁺T_{reg} produtoras de IL-10. Portanto possui a capacidade de atenuar a auto-imunidade otimizando o equilíbrio entre as respostas Th1/Th2 e induzindo a diferenciação de células Treg (WANG *et al.*, 2015).

Algumas relações desvantajosas foram encontradas relacionadas a *B. fragilis*, como a causa de abscessos pós-cirúrgicos, mas apenas quando há contaminação dos tecidos extra-intestinais e foi proposto como um mecanismo de defesa microbiano (MAZMANIAN; KASPER, 2006).

Wang *et al.* (2021), ao citarem exemplos de bactérias “condutoras” de estados promotores de câncer cólon-retal, apontam uma cepa de *B. fragilis* (ETBF) como uma potencial bactéria impulsionadora, pois esta secreta toxina que estimula a proliferação celular e doença inflamatória intestinal, levando à iniciação do processo do câncer.

5.4.5.8 *Akkermansia muciniphila*

Akkermansia muciniphila representou 1,35% da abundância relativa média com 58,8% de prevalência. De forma individual nos indivíduos amostrados, a abundância variou de 0% a 14,88%. Faz parte do Filo Verrucomicrobia, Classe Verrucomicrobiae, Ordem Verrucomicrobiales, Família Akkermansiaceae, Gênero *Akkermansia*.

Akkermansia muciniphila é o primeiro membro e o único representante do filo Verrucomicrobia no intestino humano (DERRIEN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2019), o que também foi observado neste trabalho.

Akkermansia muciniphila é abundante na camada mucosa intestinal do hospedeiro, com um número maior no ceco. É onipresente no intestino de adultos e crianças saudáveis e é responsável por 1–4% da microbiota intestinal total desde o início da vida (DERRIEN *et al.*, 2008), mas reduz gradativamente com o envelhecimento (COLLADO *et al.*, 2007). *A. muciniphila* está presente no leite humano e por isso presente em bebês recém-nascidos (COLLADO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2019).

A abundância relativa de *A. muciniphila* nos controles (n=6) da nossa amostra obtiveram 1% e, quando comparamos os casos de sintomas ou diagnósticos, verificamos um aumento desta distribuição em indivíduos com ansiedade e depressão (n=15) para 3,57% e diabetes (n=3) para 2,26%. Já em indivíduos acometidos por diarreia (n = 3) vimos uma redução para 0,62%, náuseas (n = 5) para 0,09% e em obesidade (n=14) para 0,1%. Mas nos testes estatísticos esta associação com o peso não foi significativa.

Akkermansia muciniphila é Gram-negativo, portanto possui LPS, com células ovais não móveis não formadora de esporos, um anaeróbio estrito isolado de fezes humanas, usa a mucina como única fonte de elementos de carbono e nitrogênio, e pode crescer sem vitaminas, mas é provável que, in vivo, um processo cooperativo seja necessário para alcançar a degradação eficiente da estrutura complexa da mucina. O pH ótimo para crescimento foi 6,5 (pH 5,5-8) em 37°C (20-40°C). Nenhum crescimento foi observado em glicose, celobiose, lactose, galactose, xilose, fucose, ramnose, maltose, succinato, acetato, fumarato, butirato, lactato, casítone, Cas-aminoácidos, triptona, peptona, extrato de levedura, prolina, glicina, aspartato, serina, treonina, glutamato, alanina, N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina após 4 semanas de incubação. Presume-se que a capacidade limitada da *A. muciniphila* de crescer, nos muitos substratos testados, pode ser devido à estrutura complexa da mucina, que é composta por oligossacarídeos e aminoácidos, e que esta espécie requer uma combinação de todos estes componentes para atingir uma alta densidade. Capaz de crescer em mucina gástrica, infusão de cérebro-coração, em meio Columbia, e em N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e glicose quando esses três açúcares estão na presença de peptona, extrato de levedura, casítone e triptona (DERRIEN *et al.*, 2004).

Como metabólitos produzidos, *A. muciniphila* não produziu H₂, mas acetato, propionato e etanol a partir da fermentação da mucina. Nenhum sulfeto foi produzido. Os sulfatos foram liberados durante a fermentação da mucina (0,71 mM), demonstrando a atividade da sulfatase. Em meio de mucina, o organismo pode crescer como células isoladas ou em pares, mas raramente em cadeias; frequentemente formavam agregados nos quais uma camada translúcida de material era observada entre os organismos (DERRIEN *et al.*, 2004). Os principais metabólitos produzidos são propionato e butirato (ZHANG *et al.*, 2019).

In vivo algumas condutas são conhecidas por aumentar a abundância de *A. muciniphila*, como o jejum e o uso de arabinose ou inulina (ZHANG *et al.*, 2019)

Em estudo de associação de todo metagenoma com os dados do MetaHIT, foi observado em indivíduos com diagnóstico de DM tipo 2 aumento significativo na abundância de *A. muciniphila*, que foi relacionado ao aumento na degradação de mucina, reduzindo a barreira de muco (QIN *et al.*, 2012).

Apesar disso, *A. muciniphila* ainda não foi claramente associada a nenhuma doença ou sinal de doença. A potencial patogenicidade se deve principalmente ao processo de adesão e degradação da camada de muco intestinal, que pode envolver alguns comportamentos patogênicos iniciais. Entretanto, *A. muciniphila* está mais associada à camada externa de muco e não atinge a camada interna mais próxima ao epitélio, o que se mostra necessário para a patogenicidade. Não há evidências de que ela *per se* cause patogenicidade e a sinergia com outras bactérias para causar doenças deve ser investigada, mas é considerada segura (ZHANG *et al.*, 2019).

Um baixo nível de *A. muciniphila* no intestino pode resultar no adelgaçamento da mucosa, levando ao enfraquecimento da função de barreira intestinal, tornando mais fácil para as toxinas invadirem o hospedeiro. Esta redução foi associada a alguns distúrbios metabólicos e doenças inflamatórias, como obesidade, DM2, DII, autismo e atopia relacionada com IgE (ZHANG *et al.*, 2019). *Akkermansia muciniphila* participa da regulação imunológica do hospedeiro e melhora a integridade das células epiteliais intestinais e a espessura da camada de muco, promovendo assim a saúde intestinal (EVERARD *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019).

No trabalho de Everard *et al.* (2013), o uso de cepas viáveis de *A. muciniphila* reverteu os distúrbios metabólicos induzidos por dieta rica em gorduras (HFD), como resistência à insulina, inflamação do tecido adiposo, ganho de gordura, endotoxemia metabólica. Também aumentou os níveis de endocanabinóides que controlam a inflamação, integridade da barreira intestinal e

secreção de peptídeos intestinais, incluindo peptídeo RegIIIgama (ZHANG, 2016). Diversas pesquisas relataram que a metformina, oligofrutose, polifenóis do chá verde e aveia podem aumentar a proporção de *A. muciniphila* (DENG *et al.*, 2021).

No estudo exploratório realizado por Depommier *et al.* (2019), com uso de suplementação de *A. muciniphila* pasteurizada, viva ou placebo, em humanos, durante 3 meses, a suplementação reduziu em 30% os níveis de insulina plasmática, a quantidade de LPS plasmático em comparação com a linha de base (tempo 0) e também em relação ao placebo. A suplementação elevou a sensibilidade à insulina em 30% e os níveis de abundância de *A. muciniphila* nas fezes após os 3 meses, mas não alterou a estrutura geral do microbioma. Levou a perda de peso, redução de gordura corporal, redução de circunferências de quadril de forma significativa.

5.4.6 Espécies mais prevalentes (em mais de 90% dos indivíduos amostrados)

5.4.6.1 *Fusicatenibacter saccharivorans*

Fusicatenibacter saccharivorans se mostrou prevalente em 95,29% das amostras, com 0,62% da abundância relativa média geral nas amostras. Individualmente, a abundância relativa variou de 0 a 6,4%. Faz parte do Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem dos Clostridiales, Família Lachnospiraceae, Gênero *Fusicatenibacter*.

Identificadas por Takada *et al.* (2013) a partir de amostras de fezes humanas, possuem forma de fuso, com coloração Gram-positiva, obrigatoriamente anaeróbica, não móvel, não formadora de esporos. Todos os isolados produziram ácido lático, ácido fórmico, ácido acético e ácido succínico como produtos finais da fermentação a partir da glicose. Capaz de produzir ácidos a partir de lactose, sacarose, maltose, rafinose, salicina, xilose, arabinose, celobiose, manose, sorbitol, ramnose, trealose, inulina e melezitose (fraca), mas não manitol e glicerol.

Em nosso trabalho sua abundância relativa reduziu com o avançar da idade.

Lee *et al.* (2019) investigaram as diferenças entre a composição da microbiota intestinal em pacientes com artrite reumatóide (AR) e aqueles com osteoartrite (OA). Identificaram que a abundância de *F. saccharivorans* foi menor no grupo AR quando comparadas ao grupo OA. As propriedades microbianas do intestino diferiram entre pacientes com AR e OA, e a disbiose com

AR revelou resultados semelhantes aos de outras doenças autoimunes, sugerindo que um padrão específico de microbiota intestinal está relacionado à autoimunidade.

Ao avaliar amostras de fezes de pacientes cirróticos, Jin *et al.* (2019) encontraram menor conteúdo de SCFAs e capacidade reduzida de produzir SCFAs em fermentações em lote, sendo a produção de butirato a mais anormal. Essas reduções funcionais foram mais pronunciadas conforme maior gravidade da doença hepática. A abundância de *Ruminococcus faecis*, *Faecalicatena fissicatena* e *Fusicatenibacter saccharivorans* foram positivamente correlacionadas com a produção de SCFAs, sendo possível associar a disbiose cirrótica a uma diminuição da capacidade de fermentar carboidratos não digeríveis em SCFAs, especialmente em butirato.

Crobach *et al.* (2020) investigaram a composição da microbiota intestinal em indivíduos colonizados ou infectados por *Clostridioides difficile* comparados com indivíduos controle e puderam associar estas condições à redução de diversidade bacteriana. Foi possível verificar um aumento gradativo de *Clostridioides* de controles para pacientes colonizados e pacientes infectados. Os indivíduos controles tinham abundância significativamente maior de *Eubacterium hallii* e *Fusicatenibacter* do que os pacientes colonizados. A análise da rede indicou que *Fusicatenibacter* foi associado negativamente com *Clostridioides* em pacientes com infecção, enquanto *Veillonella* foi positivamente associado com *Clostridioides* em pacientes em colonização por *C. difficile*.

No trabalho de Ma *et al.* (2021), em que analisaram o impacto do uso do probiótico *Lactobacillus plantarum* P-8 na modulação do microbioma intestinal, durante 12 semanas, com o objetivo de aliviar os efeitos da ansiedade e estresse em adultos moderadamente estressados, observaram que nos indivíduos que usaram os probióticos tinham maior abundância de *B. adolescentis*, *B. longum*, *F. prausnitzii*, *Subdoligranulum sp. 60_17*, mas apresentaram redução de *Roseburia faecis* e *Fusicatenibacter saccharivorans*. Quando analisadas as vias relacionadas à síntese e degradação na neuroatividade na semana 12, as amostras dos receptores de probióticos tinham módulos mais diversos participando da síntese de menaquinona (vitamina K2) I, síntese de GABA e metabolismo de SCFAs, além de terem a degradação de cortisol. De forma interessante, os que receberam probióticos aumentaram a presença de módulos de produção de histamina na semana 12. É importante dizer que ambos os grupos receberam maltodextrina como adjuvante.

O fungo *Hericium erinaceus* tem sido estudado como comestível e medicinal. Para investigar estes benefícios, Xie *et al.* (2021) analisaram a microbiota intestinal de indivíduos

adultos que utilizavam o pó de *H. erinaceus* como suplemento e descobriram que estes possuíam maior diversidade alfa e regulou positivamente a abundância relativa de bactérias produtoras de SCFAs, dentre elas *F. saccharivorans*.

5.4.6.2 *Ruthenibacterium lactatiformans*

Ruthenibacterium lactatiformans esteve presente em 91,76% das amostras, mostrando-se altamente prevalente, e apresentou 0,31% da abundância média relativa geral. De forma individual de 0 a 4,75% de abundância relativa nas amostras. Faz parte do Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem dos Clostridiales, Família Ruminococcaceae, Gênero *Ruthenibacterium*.

Isoladas e identificadas, a partir de amostras de fezes humanas de indivíduos russos saudáveis, em 2016, por Shkoporov *et al.*, duas cepas de bactérias Gram-negativas em forma de bastonete, obrigatoriamente anaeróbia, não móveis, nem formadoras de esporos. Caracterizadas por metabolismo fermentativo mesofílico produtoras de ácido lático, succínico e acético a partir da fermentação da glicose. Não formadoras de butirato. Possuem glicosil-hidrolases, como α - and β -galactidases, α - and β -glucosidases, β -glucuronidase, α -mannosidase, β -N-acetylglucosaminidase, but not for α -arabinosidase, α -L-fucosidase, β -D-fucosidase, and β -mannosidase. Estes microorganismos não metabolizam proteínas, especializando-se em carboidratos. Produziram ácidos a partir de maltose, salicina, D-galactose, L-ramnose, fracamente de D-manose, melibiose e D-sorbitol. Os resultados a partir de sacarose foram variados. Sua composição de ácidos graxos era em maioria de mono-insaturados.

No estudo RESISTA-PD de Becker *et al.* (2021) com idosos portadores de Doença de Parkinson (DP) para as concentrações absolutas de butirato, o algoritmo selbal detectou maiores concentrações partindo de *Ruthenibacterium lactatiformans* para *Fusicatenibacter saccharivorans*, o que se mostra condizente com a literatura científica quanto à capacidade produtiva de butirato de ambas (não produtora e produtora, respectivamente). O mesmo resultado foi observado quando comparado *R. lactatiformans* com *Dorea longicatena* e com *Blautia wexlerae*. Apesar destas bactérias não produzirem diretamente butirato, mas sim lactato e succinato por fermentação de amido resistente, estes ácidos servem de substrato para bactérias produtoras de butirato. O aumento de butirato intestinal se relacionou com menores eliminações de calprotectina. Este é um marcador intestinal validado para inflamação subclínica intestinal, pois é parte de leucócitos humanos, e a

migração destes para o lúmen e sua eliminação nas fezes demonstra maior estado inflamatório intestinal.

5.5 ALFA DIVERSIDADE

Encontramos diferença significativa para raridade. A mediana da Raridade geral foi de 0,0079 (0,00014 a 0,0685). Quando separado entre os sexos, houve diferença significativa verificada através do teste de Mann-Whitney ($p = 0,016$), com mediana de 0,0054 (0,0012 a 0,0127) para o sexo feminino e mediana de 0,0139 (0,0050 a 0,0246) para o sexo masculino. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis mostrou que há diferença na Raridade entre os sexos nos diferentes grupos etários [$H(7) = 14,52$; $p = 0,04266$]. O teste post-hoc de Dunn mostrou que há diferenças entre os grupos etários FEM até 40 anos e FEM de 41 a 50 anos ($p = 0,034$); entre FEM até 40 e MASC até 40 anos ($p = 0,0058$) e entre os grupos FEM até 40 anos e MASC de 41 a 50 anos ($p = 0,014$). Não encontramos na literatura resultados semelhantes.

5.6 BETA DIVERSIDADE

Quando analisamos a beta diversidade dividida em 2 clusters (ver gráfico 41), verificamos que pudemos identificar 2 enterótipos diferentes, um representado por *Prevotella copri* e o outro pelos *Bacteroides*, assim como em outros estudos que encontraram apenas dois tipos (WU *et al.*, 2011; YATSUNENKO *et al.*, 2012; COSTEA *et al.*, 2017).

Quando analisamos divididos em 3 ou 4 clusters não foi possível caracterizar os enterótipos característicos. Esta ausência de identificação na divisão dos 4 clusters também ocorreu em Falony *et al.* (2016), por isso mantivemos os gráficos no trabalho.

Entendemos que os enterótipos representam uma maneira de capturar as composições microbianas mais abundantes do intestino humano, e que podem ser úteis em alguns contextos, mas não consideramos válido substituir outras associações diretas e estatísticas mais individualizadas, assim como discutido por Costea *et al.* (2017), e foi desta forma como trabalhamos estes dados.

5.7 ÍNDICE DE SAÚDE DO MICROBIOMA INTESTINAL (GMHI)

Em nosso estudo, utilizamos dados de metagenoma de amostras de indivíduos com características urbanas e industrializadas. Os questionários foram respondidos pelos participantes e os dados foram auto-referidos para sintomas e doenças, portanto, para ligar nossos resultados a condições de saúde ou doença, utilizamos o índice GMHI.

Pudemos encontrar em nossa análise, 23 das 50 espécies identificadas por Gupta *et al.* (2020) como assinaturas do microbioma intestinal associado à saúde ou ausência de saúde em nossa amostra, mas não todas.

A mediana do índice GMHI dos controles (n=6) analisados ficou em -0,156, (-2,71 a 0,93), indicando um valor aproximado de zero, mas ainda negativo. A mediana do índice GMHI das amostras casos (n=79) analisados ficou em -1,81 (-3,8 a 1,84), indicando um valor negativo. Não obtivemos em nenhuma amostra valores extremos (abaixo de -4 ou acima de 4) no índice ligado à ausência de doença ou a desfechos saudáveis, conforme as análises dos autores do índice. Não houve diferenças estatísticas entre os resultados.

Portanto, tanto na mediana das amostras consideradas saudáveis, como nas consideradas não saudáveis, obtivemos valores negativos. É importante salientar que foram apenas 6 nossos indivíduos controles, o que parece ter sido importante para os valores do índice GMHI ficarem negativos. No estudo de Gupta *et al.* (2020) diversos indivíduos considerados saudáveis obtiveram o valor do índice negativo, sendo concluído que as classificações erradas, associadas ao índice e ao estado de saúde e doença, são em parte devido à natureza estocástica e altamente personalizada das ecologias do microbioma intestinal que foram abordadas até aqui; todos os quais complicam a identificação de assinaturas confiáveis de saúde.

Portanto, mais estudos são necessários para identificar e validar a aplicação deste índice nos estudos de microbioma para a população brasileira.

6 CONCLUSÕES

Nas amostras do microbioma humano intestinal de brasileiros que analisamos utilizando a tecnologia de Whole Genome Sequencing Shotgun (WGS-shotgun), encontramos no Reino Bacteria um total de 11 filos, 21 classes, 32 ordens, 56 famílias, 128 Gêneros e 357 Espécies até a ordem de 10^{-4} (0,1% da abundância relativa média) em pelo menos 1 indivíduo amostrado.

Encontramos até a abundância relativa média total de 1% os 5 filos: Bacteroidetes (65,11%), Firmicutes (29%), Proteobactérias (2,71%), Actinobactérias (1,72%) e Verrucomicrobia (1,35%). Mais de 90% da abundância relativa média total sendo composta pelos filos de Firmicutes e Bacteroidetes. Estas observações também foram realizadas pelos grandes estudos populacionais do microbioma intestinal, mesmo com proporções de abundâncias diferentes por filos.

Identificamos uma maior abundância do filo dos Bacteroidetes em relação ao Firmicutes, como em algumas outras populações europeias, americanas e asiáticas. Levantamos hipóteses com base na literatura científica para estes achados na população brasileira, como a temperatura ambiental mais elevada e a latitude reduzida, sendo fatores que podem influenciar a redução do filo dos Firmicutes. Já os fatores que podem favorecer o florescimento do filo dos Bacteroidetes, são latitude reduzida e hábitos alimentares característicos brasileiros, como o consumo frequente de leguminosas e cereais (feijão e arroz). Além da influência das questões metodológicas complexas utilizadas para os estudos do microbioma que podem culminar em discrepâncias dos resultados.

Identificamos 8 gêneros bacterianos como pertencentes ao núcleo do microbioma (presentes em mais de 95% das amostras analisadas), resultado que se mostrou reduzido frente à literatura científica. Sugerimos o aumento do número de amostras brasileiras para aprimorar este dado.

A amostra utilizada neste estudo possui a característica urbana e industrializada, com estilo de vida ocidental, sendo exposta a fatores como estresse, alimentação industrializada, mas também rica em vegetais e frutas, água tratada, boas condições de saneamento básico, uso de medicamentos e antibióticos, dentre outros fatores característicos.

Obtivemos a dominância dos gêneros *Bacteroides* seguido por *Prevotella* e *Alistipes*. Esta variação também ficou muito evidente quando avaliada a beta diversidade, com a caracterização destes dois enterótipos: *Bacteroides* e *Prevotella copri*. É uma característica da

amostra industrializada o enriquecimento de *Bacteroides* e *Alistipes*, o que foi observado em nosso trabalho.

Os achados condizem com o padrão de vida caracterizado na literatura científica, mas ainda encontramos algumas espécies relacionadas aos táxons VANISH (Voláteis e/ou Associados Negativamente às Sociedades Industrializadas de Humanos).

Portanto, propomos, para caracterizar a população brasileira em transição para o urbano e industrial, o gênero *Bacteroides* como representante.

Estas amostras fazem parte de um banco de dados, que está sendo montado com dados de metagenômica por Shotgun, portanto inédito na população brasileira.

São fundamentais novos estudos populacionais, e de maiores proporções, para que sejam geradas assinaturas metagenômicas do microbioma da população brasileira em sua grande diversidade de estilos de vida.

REFERÊNCIAS

A COBB, Brian; KASPER, Dennis L. Characteristics of carbohydrate antigen binding to the presentation protein HLA-DR. **Glycobiology**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 707-718, 4 jun. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwn050>.

ADLERBERTH, I; WOLD, Ae. Establishment of the gut microbiota in Western infants. **Acta Paediatrica**, [S.L.], v. 98, n. 2, p. 229-238, 12 jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x>.

AGUIRRE, Marisol; VENEMA, Koen. Does the Gut Microbiota Contribute to Obesity? Going beyond the Gut Feeling. **Microorganisms**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 213-235, 27 abr. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms3020213>.

ALENCAR, Rodrigo Maciel. **CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DO MICROBIOMA BACTERIANO INTESTINAL DE COMUNIDADES AMERÍNDIAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**. 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.

ALMEIDA, Alexandre; NAYFACH, Stephen; BOLAND, Miguel; STROZZI, Francesco; BERACOCHEA, Martin; SHI, Zhou Jason; POLLARD, Katherine S.; SAKHAROVA, Ekaterina; PARKS, Donovan H.; HUGENHOLTZ, Philip. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 105-114, 20 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0603-3>.

ALPIZAR-RODRIGUEZ, Deshira; LESKER, Till Robin; GRONOW, Achim; GILBERT, Benoît; RAEMY, Elena; LAMACCHIA, Celine; GABAY, Cem; FINCKH, Axel; STROWIG, Till. Prevalence of coprocalculus in individuals at risk for rheumatoid arthritis. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, [S.L.], v. 78, n. 5, p. 590-593, 13 fev. 2019. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214514>.

ARANAZ, Paula; RAMOS-LOPEZ, Omar; CUEVAS-SIERRA, Amanda; MARTINEZ, J. Alfredo; MILAGRO, Fermin I.; RIEZU-BOJ, Jose I.. A predictive regression model of the obesity-related inflammatory status based on gut microbiota composition. **International Journal Of Obesity**, [S.L.], v. 45, n. 10, p. 2261-2268, 15 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41366-021-00904-4>.

ARPAIA, Nicholas; RUDENSKY, Alexander Y.. Microbial metabolites control gut inflammatory responses: fig. 1.. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 111, n. 6, p. 2058-2059, 16 jan. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1323183111>.

ARUMUGAM, Manimozhiyan *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, [S.L.], v. 473, n. 7346, p. 174-180, 20 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09944>.

AZCARATE-PERIL, M. Andrea; RITTER, Andrew J.; SAVAIANO, Dennis; MONTEAGUDO-MERA, Andrea; ANDERSON, Carlton; MAGNESS, Scott T.; KLAENHAMMER, Todd R.. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 114, n. 3, p. 367-375, 3 jan. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1606722113>.

BAKIR, Mohammad Abdul; SAKAMOTO, Mitsuo; KITAHARA, Maki; MATSUMOTO, Mitsuharu; BENNO, Yoshimi. *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 56, n. 7, p. 1639-1643, 1 jul. 2006. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64257-0>.

BECKER, Anouck; SCHMARTZ, Georges Pierre; GRÖGER, Laura; GRAMMES, Nadja; GALATA, Valentina; PHILIPPEIT, Hannah; WEILAND, Jacqueline; LUDWIG, Nicole; MEESE, Eckart; TIERLING, Sascha. Effects of Resistant Starch on Symptoms, Fecal Markers and Gut Microbiota in Parkinson's Disease – The RESISTA-PD Trial. **Resista-Pd Trial**, [S.L.], v. , n. , p. 1-40, 8 fev. 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.02.07.21251098>.

BENJDIA, Alhosna; MARTENS, Eric C.; GORDON, Jeffrey I.; BERTEAU, Olivier. Sulfatases and a Radical S-Adenosyl-l-methionine (AdoMet) Enzyme Are Key for Mucosal Foraging and Fitness of the Prominent Human Gut Symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 286, n. 29, p. 25973-25982, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.228841>.

BERGER, Wolfgang H.; PARKER, Frances L.. Diversity of Planktonic Foraminifera in Deep-Sea Sediments. **Science**, [S.L.], v. 168, n. 3937, p. 1345-1347, 12 jun. 1970. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.168.3937.1345>.

BLASER, Martin J. *et al.* The Human Microbiome before Birth. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 558-560, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.014>.

BLASER, Martin J.; DEVKOTA, Suzanne; MCCOY, Kathy D.; RELMAN, David A.; YASSOUR, Moran; YOUNG, Vincent B.. Lessons learned from the prenatal microbiome controversy. **Microbiome**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-7, 12 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-020-00946-2>.

BLASER, Martin J.; FALKOW, Stanley. What are the consequences of the disappearing human microbiota? **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 887-894, 9 nov. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2245>.

BRAY, J. Roger; CURTIS, J. T.. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 325-349, out. 1957. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2307/1942268>.

BROWN, Eric M.; ARELLANO-SANTOYO, Hugo; TEMPLE, Emily R.; COSTLIOW, Zachary A.; PICHAUD, Matthieu; HALL, A. Brantley; LIU, Kai; DURNEY, Michael A.; GU, Xiebin; PLICHTA, Damian R.. Gut microbiome ADP-ribosyltransferases are widespread phage-encoded fitness factors. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 29, n. 9, p. 1351-1365, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2021.07.011>.

BUI, Thi Phuong Nam; TROISE, Antonio Dario; FOGLIANO, Vincenzo; VOS, Willem M. de. Anaerobic Degradation of N-?-Carboxymethyllysine, a Major Glycation End-Product, by Human Intestinal Bacteria. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 67, n. 23, p. 6594-6602, 15 maio 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02208>.

BÄCKHED, Fredrik; MANCHESTER, Jill K.; SEMENKOVICH, Clay F.; GORDON, Jeffrey I.. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 3, p. 979-984, 8 jan. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0605374104>.

CAO, Shi-Yu; ZHAO, Cai-Ning; XU, Xiao-Yu; TANG, Guo-Yi; CORKE, Harold; GAN, Ren-You; LI, Hua-Bin. Dietary plants, gut microbiota, and obesity: effects and mechanisms. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 92, p. 194-204, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.004>.

CASTANER, Olga; GODAY, Albert; PARK, Yong-Moon; LEE, Seung-Hwan; MAGKOS, Faidon; SHIOW, Sue-Anne Toh Ee; SCHRÖDER, Helmut. The Gut Microbiome Profile in Obesity: a systematic review. **International Journal Of Endocrinology**, [S.L.], v. 2018, n. , p. 1-9, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/4095789>.

CATO, Elizabeth P.; JOHNSON, John L.. Reinstatement of Species Rank for *Bacteroides fragilis*, *B . ovatus*, *B . distasonis*, *B . thetaiotaomi*. **Internationjaolurnalof Systematbacteriol**, Blacksburg, v. 26, n. 2, p. 230-237, abr. 1974.

CEKANAVICIUTE, Egle *et al.* Correction for Cekanaviciute et al., Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 114, n. 42, p. 8943-8943, 9 out. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1716911114>.

CHAO, Anne. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal Of Statistics**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 265-270, Não é um mês valido! 1984.

CHARBONNEAU, Mark R.; BLANTON, Laura V.; DIGIULIO, Daniel B.; RELMAN, David A.; LEBRILLA, Carlito B.; MILLS, David A.; GORDON, Jeffrey I.. A microbial perspective of human developmental biology. **Nature**, [S.L.], v. 535, n. 7610, p. 48-55, 6 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18845>.

CHATTERJEE, Bhaswati; THAKUR, Suman S.. Extend ethnicity of human microbiome. **Nature**, [S.L.], v. 487, n. 7405, p. 39-39, jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/487039d>.

CHÁVEZ-CARBAJAL, Alejandra; NIRMALKAR, Khemlal; PÉREZ-LIZAUR, Ana; HERNÁNDEZ-QUIROZ, Fernando; RAMÍREZ-DEL-ALTO, Silvia; GARCÍA-MENA, Jaime; HERNÁNDEZ-GUERRERO, César. Gut Microbiota and Predicted Metabolic Pathways in a Sample of Mexican Women Affected by Obesity and Obesity Plus Metabolic Syndrome. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 438-456, 21 jan. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20020438>.

CHO, Ilseung; BLASER, Martin J.. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 260-270, 13 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3182>.

CHOI, Yoon Jin; LEE, Dong Ho; KIM, Hyun Soo; KIM, Yoon-Keun. An exploratory study on the effect of daily fruits and vegetable juice on human gut microbiota. **Food Science And Biotechnology**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 1377-1386, 17 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-018-0372-7>.

CLAESSON, M. J.; CUSACK, S.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; WEERD, H. de; FLANNERY, E.; MARCHESI, J. R.; FALUSH, D.; DINAN, T.; FITZGERALD, G.. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 4586-4591, 22 jun. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1000097107>.

CLAESSON, Marcus J.; CLOONEY, Adam G.; O'TOOLE, Paul W.. A clinician's guide to microbiome analysis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 585-595, 9 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.97>.

COCKBURN, Darrell W.; SUH, Carolyn; MEDINA, Krizia Perez; DUVALL, Rebecca M.; WAWRZAK, Zdzislaw; HENRISSAT, Bernard; KOROPATKIN, Nicole M.. Novel carbohydrate binding modules in the surface anchored α -amylase of *Eubacterium rectale* provide a molecular rationale for the range of starches used by this organism in the human gut. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 107, n. 2, p. 249-264, dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.13881>.

COLLADO, M. Carmen; DERRIEN, Muriel; ISOLAURI, Erika; VOS, Willem M. de; SALMINEN, Seppo. Intestinal Integrity and *Akkermansia muciniphila*, a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants, Adults, and the Elderly. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 73, n. 23, p. 7767-7770, dez. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01477-07>.

CONTEVILLE, Liliane Costa; OLIVEIRA-FERREIRA, Joseli; VICENTE, Ana Carolina Paulo. Gut Microbiome Biomarkers and Functional Diversity Within an Amazonian Semi-Nomadic

Hunter–Gatherer Group. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. , p. 1-10, 30 jul. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01743>.

COSTEA, Paul I. *et al.* Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 8-16, 18 dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>.

COSTELLO, Elizabeth K.; STAGAMAN, Keaton; DETHLEFSEN, Les; BOHANNAN, Brendan J. M.; RELMAN, David A.. The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. **Science**, [S.L.], v. 336, n. 6086, p. 1255-1262, 8 jun. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1224203>.

COUTO, Sebastião Enes Reis. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status sanitário. In: A ANDRADE,; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.s.. **Animais de Laboratório:: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 388. Disponível em: <http://books.scielo.org>. Acesso em: 20 ago. 2021.

CROBACH, Monique J. T.; DUCARMON, Quinten R.; TERVEER, Elisabeth M.; HARMANUS, Celine; SANDERS, Ingrid M. J. G.; VERDUIN, Kees M.; KUIJPER, Ed J.; ZWITTINK, Romy D.. The Bacterial Gut Microbiota of Adult Patients Infected, Colonized or Noncolonized by *Clostridioides difficile*. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 677-690, 6 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8050677>.

DANKO, David *et al.* A global metagenomic map of urban microbiomes and antimicrobial resistance. **Cell**, [S.L.], v. 184, n. 13, p. 3376-3393, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.002>.

DAVIS-RICHARDSON, Austin G.; ARDISSONE, Alexandria N.; DIAS, Raquel; SIMELL, Ville; LEONARD, Michael T.; KEMPPAINEN, Kaisa M.; DREW, Jennifer C.; SCHATZ, Desmond; ATKINSON, Mark A.; KOLACZKOWSKI, Bryan. *Bacteroides dorei* dominates gut microbiome prior to autoimmunity in Finnish children at high risk for type 1 diabetes. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. , p. 1-11, 10 dez. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00678>.

DEMIRCI, M.; TOKMAN, H.B.; UYSAL, H.K.; DEMIRYAS, S.; KARAKULLUKCU, A.; SARIBAS, S.; COKUGRAS, H.; KOCAZEYBEK, B.s.. Reduced *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* levels in the gut microbiota of children with allergic asthma. **Allergologia Et Immunopathologia**, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 365-371, jul. 2019. Codon Publications. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2018.12.009>.

DEPOMMIER, Clara; EVERARD, Amandine; DRUART, Céline; PLOVIER, Hubert; VAN HUL, Matthias; VIEIRA-SILVA, Sara; FALONY, Gwen; RAES, Jeroen; MAITER, Dominique; DELZENNE, Nathalie M.. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 1096-1103, jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0495-2>.

DERRIEN, Muriel; COLLADO, M. Carmen; BEN-AMOR, Kaouther; SALMINEN, Seppo; VOS, Willem M. de. The Mucin Degrader *Akkermansia muciniphila* Is an Abundant Resident of the Human Intestinal Tract. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 74, n. 5, p. 1646-1648, mar. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01226-07>.

DERRIEN, Muriel; VAUGHAN, Elaine E.; PLUGGE, Caroline M.; VOS, Willem M. de. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 54, n. 5, p. 1469-1476, 1 set. 2004. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>.

DEWULF, Evelyne M; CANI, Patrice D; CLAUS, Sandrine P; FUENTES, Susana; PUYLAERT, Philippe Gb; NEYRINCK, Audrey M; BINDELS, Laure B; VOS, Willem M de; GIBSON, Glenn R; THISSEN, Jean-Paul. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. **Gut**, [S.L.], v. 62, n. 8, p. 1112-1121, 7 nov. 2012. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303304>.

DHAKAN, D B; A MAJI,; SHARMA, A K; SAXENA, R; PULIKKAN, J; GRACE, T; A GOMEZ,; SCARIA, J; AMATO, K R; SHARMA, V K. The unique composition of Indian gut microbiome, gene catalogue, and associated fecal metabolome deciphered using multi-omics approaches. **Gigascience**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 1-20, 30 jan. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gigascience/giz004>.

DUBOS, Rene; SCHAEGLER, Russell W.; COSTELLO, Richard; HOET, Philippe. INDIGENOUS, NORMAL, AND AUTOCHTHONOUS FLORA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 122, n. 1, p. 67-76, 1 jul. 1965. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.122.1.67>.

DUNCAN, S. H.. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 52, n. 6, p. 2141-2146, 1 nov. 2002. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02241-0>.

DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J.. Proposal of a neotype strain (A1-86) for *Eubacterium rectale*. Request for an Opinion. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 58, n. 7, p. 1735-1736, 1 jul. 2008. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.2008/004580-0>.

ESLINGER, Amanda J.; ELLER, Lindsay K.; REIMER, Raylene A.. Yellow pea fiber improves glycemia and reduces *Clostridium leptum* in diet-induced obese rats. **Nutrition Research**, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 714-722, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2014.07.016>.

EVERARD, A.; BELZER, C.; GEURTS, L.; OUWERKERK, J. P.; DRUART, C.; BINDELS, L. B.; GUIOT, Y.; DERRIEN, M.; MUCCIOLI, G. G.; DELZENNE, N. M.. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings**

Of The National Academy Of Sciences, [S.L.], v. 110, n. 22, p. 9066-9071, 13 maio 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1219451110>.

FAITH, Jeremiah J.; AHERN, Philip P.; RIDAURA, Vanessa K.; CHENG, Jiye; GORDON, Jeffrey I. Identifying Gut Microbe–Host Phenotype Relationships Using Combinatorial Communities in Gnotobiotic Mice. **Science Translational Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 220, p. 1-24, 22 jan. 2014. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3008051>.

FALONY, Gwen *et al.* Population-level analysis of gut microbiome variation. **Science**, [S.L.], v. 352, n. 6285, p. 560-564, 29 abr. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad3503>.

FERNÁNDEZ-MURGA, M. Leonor; SANZ, Yolanda. Safety Assessment of *Bacteroides uniformis* CECT 7771 Isolated from Stools of Healthy Breast-Fed Infants. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-21, 19 jan. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145503>.

FETTWEIS, Jennifer M.; SERRANO, Myrna G.; BROOKS, J. Paul; EDWARDS, David J.; GIRERD, Philippe H.; PARIKH, Hardik I.; HUANG, Bernice; ARODZ, Tom J.; EDUPUGANTI, Laahirie; GLASCOCK, Abigail L.. The vaginal microbiome and preterm birth. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 29 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0450-2>.

FILIPPO, C. de; CAVALIERI, D.; PAOLA, M. di; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P.. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 107, n. 33, p. 14691-14696, 2 ago. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005963107>.

FORSTER, Samuel C.; KUMAR, Nitin; ANONYE, Blessing O.; ALMEIDA, Alexandre; VICIANI, Elisa; STARES, Mark D.; DUNN, Matthew; MKANDAWIRE, Tapoka T.; ZHU, Ana; SHAO, Yan. A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 186-192, fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-018-0009-7>.

FRAGIADAKIS, Gabriela K.; SMITS, Samuel A.; SONNENBURG, Erica D.; VAN TREUREN, William; REID, Gregor; KNIGHT, Rob; MANJURANO, Alphaxard; CHANGALUCHA, John; DOMINGUEZ-BELLO, Maria Gloria; LEACH, Jeff. Links between environment, diet, and the hunter-gatherer microbiome. **Gut Microbes**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 216-227, 17 ago. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2018.1494103>.

GAIL, Mitchell H; WAN, Yunhu; SHI, Jianxin. Power of Microbiome Beta-Diversity Analyses Based on Standard Reference Samples. **American Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 190, n. 3, p. 439-447, 25 set. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwaa204>.

GAO, Xuefeng *et al.* Body Mass Index Differences in the Gut Microbiota Are Gender Specific. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. , p. 1-10, 22 jun. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01250>.

GAUFFIN-CANO, Paola; SANTACRUZ, Arlette; MOYA, Ángela; SANZ, Yolanda. Bacteroides uniformis CECT 7771 Ameliorates Metabolic and Immunological Dysfunction in Mice with Hig. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 1-16, 26 jul. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041079>.

GILBERT, Jack A.; QUINN, Robert A.; DEBELIUS, Justine; XU, Zhenjiang Z.; MORTON, James; GARG, Neha; JANSSEN, Janet K.; DORRESTEIN, Pieter C.; KNIGHT, Rob. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. **Nature**, [S.L.], v. 535, n. 7610, p. 94-103, 6 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18850>.

GILBERT, Jack; BLASER, Martin J; CAPORASO, J Gregory; JANSSEN, Janet K; LYNCH, Susan V; KNIGHT, Rob. Current understanding of the human microbiome. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 392-400, abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4517>.

GILL, P. A.; VAN ZELM, M. C.; MUIR, J. G.; GIBSON, P. R.. Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 15-34, 3 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/apt.14689>.

GILL, Samantha K.; ROSSI, Megan; BAJKA, Balazs; WHELAN, Kevin. Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 101-116, 18 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-020-00375-4>.

GOMEZ, Andres; LUCKEY, David; TANEJA, Veena. The gut microbiome in autoimmunity: sex matters. **Clinical Immunology**, [S.L.], v. 159, n. 2, p. 154-162, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2015.04.016>.

GOODMAN, Andrew L.; MCNULTY, Nathan P.; ZHAO, Yue; LEIP, Douglas; MITRA, Robi D.; LOZUPONE, Catherine A.; KNIGHT, Rob; GORDON, Jeffrey I.. Identifying Genetic Determinants Needed to Establish a Human Gut Symbiont in Its Habitat. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 279-289, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.08.003>.

GRITZ, Emily C.; BHANDARI, Vineet. The Human Neonatal Gut Microbiome: a brief review. **Frontiers In Pediatrics**, [S.L.], v. 3, n. , p. 1-12, 5 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fped.2015.00017>.

GUARALDI, Federica; SALVATORI, Guglielmo. Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 2, n. , p. 1-4, 2012. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2012.00094>.

GUPTA, Vinod K.; KIM, Minsuk; BAKSHI, Utpal; CUNNINGHAM, Kevin Y.; DAVIS, John M.; LAZARIDIS, Konstantinos N.; NELSON, Heidi; CHIA, Nicholas; SUNG, Jaeyun. A predictive index for health status using species-level gut microbiome profiling. **Nature Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-16, 15 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18476-8>.

GUPTA, Vinod K.; PAUL, Sandip; DUTTA, Chitra. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. , p. 1-16, 23 jun. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>.

HAN, Kyu-Ho; OHASHI, Shunsuke; SASAKI, Keiko; NAGATA, Ryuji; PELPOLAGE, Samantha; FUKUMA, Naoki; REED, Jess D.; SHIMADA, Ken-Ichiro; KADOYA, Norimichi; FUKUSHIMA, Michihiro. Dietary adzuki bean paste dose-dependently reduces visceral fat accumulation in rats fed a normal diet. **Food Research International**, [S.L.], v. 130, n. , p. 1-8, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108890>.

HAO, Zikai; WANG, Wei; GUO, Rong; LIU, Hong. Faecalibacterium prausnitzii (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats. **Psychoneuroendocrinology**, [S.L.], v. 104, n. , p. 132-142, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.02.025>.

HE, Xiaoya; ZHAO, Shuyang; LI, Yan. Faecalibacterium prausnitzii: a next-generation probiotic in gut disease improvement. **Canadian Journal Of Infectious Diseases And Medical Microbiology**, [S.L.], v. 2021, n. , p. 1-10, 5 mar. 2021. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/6666114>.

HIPPE, B.; REMELY, M.; AUMUELLER, E.; POINTNER, A.; MAGNET, U.; HASLBERGER, A.G.. Faecalibacterium prausnitzii phylotypes in type two diabetic, obese, and lean control subjects. **Beneficial Microbes**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 511-517, 1 set. 2016. Wageningen Academic Publishers. <http://dx.doi.org/10.3920/bm2015.0075>.

HJORTH, M F; ROAGER, H M; LARSEN, T M; POULSEN, S K; LICHT, T R; BAHL, M I; ZOHAR, Y; A ASTRUP,. Pre-treatment microbial Prevotella-to-Bacteroides ratio, determines body fat loss success during a 6-month randomized controlled diet intervention. **International Journal Of Obesity**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 580-583, 8 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2017.220>.

HOLMES, Zachary C.; SILVERMAN, Justin D.; DRESSMAN, Holly K.; WEI, Zhengzheng; DALLOW, Eric P.; ARMSTRONG, Sarah C.; SEED, Patrick C.; RAWLS, John F.; DAVID, Lawrence A.. Short-Chain Fatty Acid Production by Gut Microbiota from Children with Obesity Differs According to Prebiotic Choice and Bacterial Community Composition. **Mbio**, [S.L.], v.

11, n. 4, p. 1-15, 25 ago. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00914-20>.

HOOGEN, Ward J. van Den; LAMAN, Jon D.; HART, Bert A. 'T. Modulation of Multiple Sclerosis and Its Animal Model Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Food and Gut Microbiota. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 8, n. , p. 1-24, 5 set. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.01081>.

HUGHES, Jennifer B.; HELLMANN, Jessica J.; RICKETTS, Taylor H.; BOHANNAN, Brendan J. M.. Counting the Uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 67, n. 10, p. 4399-4406, out. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.10.4399-4406.2001>.

HUTTENHOWER, Curtis *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, [S.L.], v. 486, n. 7402, p. 207-214, jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11234>.

HYUN, Yang-Jin; LEE, Jeong Hoon; KIM, Dong-Hyun. Cloning, overexpression, and characterization of recombinant heparinase III from *Bacteroides stercoris* HJ-15. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 879-890, 12 nov. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2327-7>.

JASAREVIC, Eldin *et al.* Sex differences in the gut microbiome–brain axis across the lifespan. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 371, n. 1688, p. 122-134, 19 fev. 2016. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0122>.

JHA, Aashish R.; DAVENPORT, Emily R.; GAUTAM, Yoshina; BHANDARI, Dinesh; TANDUKAR, Sarmila; NG, Katharine M.; FRAGIADAKIS, Gabriela K.; HOLMES, Susan; GAUTAM, Guru Prasad; LEACH, Jeff. Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. **Plos Biology**, [S.L.], v. 16, n. 11, p. 1-30, 15 nov. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.2005396>.

JIN, Mingliang; KALAINY, Sylvia; BASKOTA, Nami; CHIANG, Diana; DEEHAN, Edward C.; MCDOUGALL, Chelsea; TANDON, Puneeta; MARTÍNEZ, Inés; CERVERA, Carlos; WALTER, Jens. Faecal microbiota from patients with cirrhosis has a low capacity to ferment non?digestible carbohydrates into short?chain fatty acids. **Liver International**, [S.L.], v. 39, n. 8, p. 1437-1447, 10 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/liv.14106>.

JOHNSON, J. L.; MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H.. *Bacteroides caccae* sp. nov., *Bacteroides merdae* sp. nov., and *Bacteroides stercoris* sp. nov. Isolated from Human Feces. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 499-501, 1 out. 1986. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-36-4-499>.

JOLY, Francisca; MAYEUR, Camille; BRUNEAU, Aurélie; NOORDINE, Marie-Louise; MEYLHEUC, Thierry; LANGELLA, Philippe; MESSING, Bernard; DUÉE, Pierre-Henri;

CHERBUY, Claire; THOMAS, Muriel. Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. **Biochimie**, [S.L.], v. 92, n. 7, p. 753-761, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.015>.

JUMPERTZ, Reiner; LE, Duc Son; TURNBAUGH, Peter J; TRINIDAD, Cathy; BOGARDUS, Clifton; GORDON, Jeffrey I; KRAKOFF, Jonathan. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 58-65, 4 maio 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.110.010132>.

KALLIOMÄKI, Marko; COLLADO, Maria Carmen; SALMINEN, Seppo; ISOLAURI, Erika. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 87, n. 3, p. 534-538, 1 mar. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/87.3.534>.

KARCHER, Nicolai; PASOLLI, Edoardo; ASNICAR, Francesco; HUANG, Kun D.; TETT, Adrian; MANARA, Serena; ARMANINI, Federica; BAIN, Debbie; DUNCAN, Sylvia H.; LOUIS, Petra. Analysis of 1321 *Eubacterium rectale* genomes from metagenomes uncovers complex phylogeographic population structure and subspecies functional adaptations. **Genome Biology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 138-165, 8 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-020-02042-y>.

KAUR, Harrisham; DAS, Chandrani; MANDE, Sharmila S.. In Silico Analysis of Putrefaction Pathways in Bacteria and Its Implication in Colorectal Cancer. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. , p. 1-13, 7 nov. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02166>.

KELLY, Denise; CAMPBELL, Jamie I; KING, Timothy P; GRANT, George; A JANSSON, Emmelie; COUTTS, Alistair G P; PETTERSSON, Sven; CONWAY, Shaun. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 104-112, 21 dez. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1018>.

KIM, Bo-Ra; SHIN, Jiwon; GUEVARRA, Robin B.; LEE, Jun Hyung; KIM, Doo Wan; SEOL, Kuk-Hwan; LEE, Ju-Hoon; KIM, Hyeun Bum; ISAACSON, Richard E.. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 27, n. 12, p. 2089-2093, 28 dez. 2017. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>.

KOVATCHEVA-DATCHARY, Petia; NILSSON, Anne; AKRAMI, Rozita; LEE, Ying Shiuan; DE VADDER, Filipe; ARORA, Tulika; HALLEN, Anna; MARTENS, Eric; BJÖRCK, Inger; BÄCKHED, Fredrik. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 971-982, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>.

KRAAL, Laurens; ABUBUCKER, Sahar; KOTA, Karthik; FISCHBACH, Michael A.; MITREVA, Makedonka. The Prevalence of Species and Strains in the Human Microbiome: a

resource for experimental efforts. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1-11, 14 maio 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097279>.

LAHTI, Leo. **Tools for microbiome analysis in R**. 2017-2020. Microbiome package version. Disponível em: <https://microbiome.github.io/tutorials/>. Acesso em: 15 dez. 2020.

LARSEN, Jeppe Madura. The immune response to Prevotellabacteria in chronic inflammatory disease. **Immunology**, [S.L.], v. 151, n. 4, p. 363-374, 20 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12760>.

LEE, Jin-Young; MANNAA, Mohamed; KIM, Yunkyung; KIM, Jehun; KIM, Geun-Tae; SEO, Young-Su. Comparative Analysis of Fecal Microbiota Composition Between Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Patients. **Genes**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 748-762, 25 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes10100748>.

LEONARD, Maureen M.; KARATHIA, Hiren; PUJOLASSOS, Meritxell; TROISI, Jacopo; VALITUTTI, Francesco; SUBRAMANIAN, Poorani; CAMHI, Stephanie; KENYON, Victoria; COLUCCI, Angelo; SERENA, Gloria. Multi-omics analysis reveals the influence of genetic and environmental risk factors on developing gut microbiota in infants at risk of celiac disease. **Microbiome**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-15, 11 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-020-00906-w>.

LEONARD, Michael T.; DAVIS-RICHARDSON, Austin G.; ARDISSONE, Alexandria N.; KEMPPAINEN, Kaisa M.; DREW, Jennifer C.; ILONEN, Jorma; KNIP, Mikael; SIMELL, Olli; TOPPARI, Jorma; VEIJOLA, Riitta. The methylome of the gut microbiome: disparate dam methylation patterns in intestinal bacteroides dorei. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. , p. 1-6, 17 jul. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00361>.

LEONG, Karen S. W.; DERRAIK, José G. B.; HOFMAN, Paul L.; CUTFIELD, Wayne S.. Antibiotics, gut microbiome and obesity. **Clinical Endocrinology**, [S.L.], v. 88, n. 2, p. 185-200, 20 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cen.13495>.

LEY, R. E.; BACKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I.. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 102, n. 31, p. 11070-11075, 20 jul. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504978102>.

LEY, Ruth e. Obesity and the human microbiome. **Current Opinion In Gastroenterology**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 5-11, jan. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mog.0b013e328333d751>.

LEY, Ruth E.; TURNBAUGH, Peter J.; KLEIN, Samuel; GORDON, Jeffrey I.. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, [S.L.], v. 444, n. 7122, p. 1022-1023, dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/4441022a>.

LI, Fei; HULLAR, Meredith A. J.; SCHWARZ, Yvonne; LAMPE, Johanna W.. Human Gut Bacterial Communities Are Altered by Addition of Cruciferous Vegetables to a Controlled Fruit- and Vegetable-Free Diet. **The Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 139, n. 9, p. 1685-1691, 29 jul. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/jn.109.108191>.

LI, Junhua; JIA, Huijue; CAI, Xianghang; ZHONG, Huanzi; FENG, Qiang; SUNAGAWA, Shinichi; ARUMUGAM, Manimozhiyan; KULTIMA, Jens Roat; PRIFTI, Edi. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 32, n. 8, p. 834-841, 6 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2942>.

LIPPERT, K.; KEDENKO, L.; ANTONIELLI, L.; KEDENKO, I.; GEMEIER, C.; LEITNER, M.; KAUTZKY-WILLER, A.; PAULWEBER, B.; HACKL, E.. Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. **Beneficial Microbes**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 545-556, 24 ago. 2017. Wageningen Academic Publishers. <http://dx.doi.org/10.3920/bm2016.0184>.

LLOYD-PRICE, Jason *et al.* Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. **Nature**, [S.L.], v. 550, n. 7674, p. 61-66, 20 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature23889>.

LOCEY, Kenneth J.; LENNON, Jay T.. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 113, n. 21, p. 5970-5975, 2 maio 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1521291113>.

LOPEZ-SILES, Mireia; DUNCAN, Sylvia H; GARCIA-GIL, L Jesús; MARTINEZ-MEDINA, Margarita. Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics. **The Isme Journal**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 841-852, 3 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2016.176>.

LORENZO, Flaviana di; PITHER, Molly D.; MARTUFI, Michela; SCARINCI, Ilaria; GUZMÁN-CALDENTEY, Joan; ?AKOMIEC, Ewelina; JACHYMEK, Wojciech; BRUIJNS, Sven C. M.; SANTAMARÍA, Sonsoles Martín; FRICK, Julia-Stephanie. Pairing Bacteroides vulgatus LPS Structure with Its Immunomodulatory Effects on Human Cellular Models. **Acs Central Science**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1602-1616, 30 jul. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscentsci.0c00791>.

MA, Teng; JIN, Hao; KWOK, Lai-Yu; SUN, Zhihong; LIONG, Min-Tze; ZHANG, Heping. Probiotic consumption relieved human stress and anxiety symptoms possibly via modulating the neuroactive potential of the gut microbiota. **Neurobiology Of Stress**, [S.L.], v. 14, n. , p. 100294-100304, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100294>.

MAGNE, Fabien; GOTTELAND, Martin; GAUTHIER, Lea; ZAZUETA, Alejandra; PESOA, Susana; NAVARRETE, Paola; BALAMURUGAN, Ramadass. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients. **Nutrients**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1474-1491, 19 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12051474>.

MALLA, Muneer Ahmad *et al.* Exploring the Human Microbiome: the potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, n. , p. 1-23, 7 jan. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02868>.

MALLICK, Himel; RAHNAVARD, Ali; MCIVER, Lauren J.; MA, Siyuan; ZHANG, Yancong; NGUYEN, Long H.; TICKLE, Timothy L.; WEINGART, George; REN, Boyu; SCHWAGER, Emma H.. Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies. **Biorxiv**, [S.L.], v. , n. , p. 1-55, 20 jan. 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.01.20.427420>. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.20.427420v1.article-info>. Acesso em: 20 jun. 2021.

MARTÍN, Rebeca; MIQUEL, Sylvie; BENEVIDES, Leandro; BRIDONNEAU, Chantal; ROBERT, Véronique; HUDAULT, Sylvie; CHAIN, Florian; BERTEAU, Olivier; AZEVEDO, Vasco; CHATEL, Jean M.. Functional Characterization of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Healthy Volunteers: a step forward in the use of f. prausnitzii as a next-generation probiotic. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. , p. 1-13, 30 jun. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01226>.

MATSUOKA, Takayuki; SHIMIZU, Takuya; MINAGAWA, Tadanori; HIRANUMA, Wakiko; TAKEDA, Miki; KAKUTA, Risako; KAWAMOTO, Shunsuke. First case of an invasive *Bacteroides dorei* infection detected in a patient with a mycotic aortic aneurysm—raising a rebellion of major indigenous bacteria in humans: a case report and review. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 625-631, 30 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-021-06345-8>.

MAUKONEN, Johanna; MÄTTÄ?, Jaana; SATOKARI, Reetta; SÄDERLUND, Hans; MATTILA-SANDHOLM, Tiina; SAARELA, Maria. PCR DGGE and RT-PCR DGGE show diversity and short-term temporal stability in the *Clostridium coccooides* Eubacterium rectale group in the human intestinal microbiota. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 517-528, dez. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00179.x>.

MAYNERIS-PERXACHS, Jordi; ARNORIAGA-RODRÍGUEZ, María; LUQUE-CÓRDOBA, Diego; PRIEGO-CAPOTE, Feliciano; PÉREZ-BROCAL, Vicente; MOYA, Andrés; BUROKAS, Aurelijus; MALDONADO, Rafael; FERNÁNDEZ-REAL, José-Manuel. Gut microbiota steroid sexual dimorphism and its impact on gonadal steroids: influences of obesity and menopausal status. **Microbiome**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-18, 20 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-020-00913-x>.

MAZMANIAN, Sarkis K.; KASPER, Dennis L.. The love–hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 849-858, 6 out. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1956>.

MAZMANIAN, Sarkis K.; LIU, Cui Hua; TZIANABOS, Arthur O.; KASPER, Dennis L.. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. **Cell**, [S.L.], v. 122, n. 1, p. 107-118, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>.

MCCRACKEN, Barbara Anne; GARCIA, M. Nathalia. Phylum Synergistetes in the oral cavity: a possible contributor to periodontal disease. **Anaerobe**, [S.L.], v. 68, n. , p. 102250, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102250>.

MIQUEL, Sylvie; LECLERC, Marion; MARTIN, Rebeca; CHAIN, Florian; LENOIR, Marion; RAGUIDEAU, Sébastien; HUDAULT, Sylvie; BRIDONNEAU, Chantal; NORTHEN, Trent; BOWEN, Benjamin. Identification of Metabolic Signatures Linked to Anti-Inflammatory Effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. **Mbio**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 1-10, maio 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00300-15>.

MOOSSAVI, Shirin. The Necessity for an Iranian Gut Microbiome Initiative. **Middle East Journal Of Digestive Diseases**, Iran, v. 6, n. 2, p. 109-110, abr. 2014.

MORGAN, Xochitl C.; SEGATA, Nicola; HUTTENHOWER, Curtis. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. **Trends In Genetics**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 51-58, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2012.09.005>.

MORRIS, E. Kathryn; CARUSO, Tancredi; BUSCOT, François; FISCHER, Markus; HANCOCK, Christine; MAIER, Tanja S.; MEINERS, Torsten; MÜLLER, Caroline; OBERMAIER, Elisabeth; PRATI, Daniel. Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the german biodiversity exploratories. **Ecology And Evolution**, [S.L.], v. 4, n. 18, p. 3514-3524, 28 ago. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.1155>.

MOURA, Rosa; OLIVEIRA, Samara; PEGO FILHO, Bolivar. **Escalas da urbanização brasileira**: texto para discussão. 2372. ed. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea), 2018. 52 p.

NAGENDRA, Harini. Opposite trends in response for the Shannon and Simpson indices of landscape diversity. **Applied Geography**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 175-186, abr. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0143-6228\(02\)00002-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0143-6228(02)00002-4).

NAKATANI, Akiho; LI, Xuan; MIYAMOTO, Junki; IGARASHI, Miki; WATANABE, Hitoshi; SUTOU, Asuka; WATANABE, Keita; MOTOYAMA, Takayasu; TACHIBANA, Nobuhiko; KOHNO, Mitsutaka. Dietary mung bean protein reduces high-fat diet-induced weight gain by modulating host bile acid metabolism in a gut microbiota-dependent manner. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 501, n. 4, p. 955-961, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.090>.

NEIL, Elizabeth S.; MCGINLEY, John N.; FITZGERALD, Vanessa K.; LAUCK, Corey A.; TABKE, Jeremy A.; STREETER-MCDONALD, Madyson R.; YAO, Linxing; BROECKLING, Corey D.; WEIR, Tiffany L.; FOSTER, Michelle T.. White Kidney Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.)

Consumption Reduces Fat Accumulation in a Polygenic Mouse Model of Obesity. **Nutrients**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 2780-2797, 15 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11112780>.

NIELSEN, H Bjørn; ALMEIDA, Mathieu; JUNCKER, Agnieszka Sierakowska; RASMUSSEN, Simon; LI, Junhua; SUNAGAWA, Shinichi; PLICHTA, Damian R; GAUTIER, Laurent; PEDERSEN, Anders G. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 32, n. 8, p. 822-828, 6 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2939>.

NIKOLOVA, Viktoriya L.; HALL, Megan R. B.; HALL, Lindsay J.; CLEARE, Anthony J.; STONE, James M.; YOUNG, Allan H.. Perturbations in Gut Microbiota Composition in Psychiatric Disorders. **Jama Psychiatry**, [S.L.], v. , n. , p. 1-12, 15 set. 2021. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2021.2573>.

OCHOA-REPÁRAZ, Javier; MIELCARZ, Daniel W.; DITRIO, Lauren E.; BURROUGHS, Ashley R.; BEGUM-HAQUE, Sakhina; DASGUPTA, Suryasarathi; KASPER, Dennis L.; KASPER, Lloyd H.. Central Nervous System Demyelinating Disease Protection by the Human Commensal *Bacteroides fragilis* Depends on Polysaccharide A Expression. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 185, n. 7, p. 4101-4108, 3 set. 2010. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1001443>.

ODAMAKI, Toshitaka; KATO, Kumiko; SUGAHARA, Hirosuke; HASHIKURA, Nanami; TAKAHASHI, Sachiko; XIAO, Jin-Zhong; ABE, Fumiaki; OSAWA, Ro. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-12, 25 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>.

OKSANEN, J. *et al.* **Vegan: Community Ecology Package**. 2020. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acesso em: 20 jun. 2021.

OLIPHANT, Kaitlyn; ALLEN-VERCOE, Emma. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. **Microbiome**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-15, 13 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>.

OLSON, Brad G.; KURLAND, Yonatan; ROSENBAUM, Paula F.; HOBART, Travis R.. Rapid Weight Gain in Pediatric Refugees after US Immigration. **Journal Of Immigrant And Minority Health**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 263-266, 8 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10903-016-0461-8>.

ONDERDONK, Andrew B.; BRONSON, Roderick; CISNEROS, Ronald. Comparison of *Bacteroides vulgatus* Strains in the Enhancement of Experimental Ulcerative Colitis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 835-836, dez. 1986.

OU, Juan-Ying; HUANG, Jun-Qing; SONG, Yuan; YAO, Sheng-Wen; PENG, XI-Chun; WANG, Ming-Fu; OU, Shi-Yi. Feruloylated Oligosaccharides from Maize Bran Modulated the Gut Microbiota in Rats. **Plant Foods For Human Nutrition**, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 123-128, 10 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-016-0547-4>.

PANNARAJ, Pia S.; LI, Fan; CERINI, Chiara; BENDER, Jeffrey M.; YANG, Shangxin; ROLLIE, Adrienne; ADISETIYO, Helty; ZABIH, Sara; LINCEZ, Pamela J.; BITTINGER, Kyle. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. **Jama Pediatrics**, [S.L.], v. 171, n. 7, p. 647-655, 1 jul. 2017. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0378>.

PARKER, Bianca J.; WEARSCH, Pamela A.; VELOO, Alida C. M.; RODRIGUEZ-PALACIOS, Alex. The Genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, n. , p. 1-15, 9 jun. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>.

PEDERSEN, Helle Krogh; GUDMUNDSDOTTIR, Valborg; NIELSEN, Henrik Bjørn; HYOTYLAINEN, Tuulia; NIELSEN, Trine; JENSEN, Benjamin A. H.; FORSLUND, Kristoffer; HILDEBRAND, Falk; PRIFTI, Edi; FALONY, Gwen. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. **Nature**, [S.L.], v. 535, n. 7612, p. 376-381, jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18646>.

PORTER, Nathan T.; LUIS, Ana S.; MARTENS, Eric C.. *Bacteroides thetaiotaomicron*. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 966-967, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.005>.

PRECUP, Gabriela; VODNAR, Dan-Cristian. Gut *Prevotella* as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 122, n. 2, p. 131-140, 28 jun. 2019. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114519000680>.

PRESCOTT, Susan L.. History of medicine: origin of the term microbiome and why it matters. **Human Microbiome Journal**, [S.L.], v. 4, p. 24-25, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humic.2017.05.004>.

PROCTOR, Lita M. *et al.* The Integrative Human Microbiome Project. **Nature**, [S.L.], v. 569, n. 7758, p. 641-648, maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>.

PROCTOR, Lita M.. The Human Microbiome Project in 2011 and Beyond. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 287-291, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.001>.

PRYDE, Susan e; DUNCAN, Sylvia H; HOLD, Georgina L; STEWART, Colin s; FLINT, Harry J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **Fems Microbiology Letters**,

[S.L.], v. 217, n. 2, p. 133-139, dez. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x>.

PULGAR, Eva M. Gómez del; BENÍTEZ-PÁEZ, Alfonso; SANZ, Yolanda. Safety Assessment of *Bacteroides Uniformis* CECT 7771, a Symbiont of the Gut Microbiota in Infants. **Nutrients**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 551-566, 20 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12020551>.

QIN, Junjie *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, [S.L.], v. 464, n. 7285, p. 59-65, mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08821>.

QIN, Junjie; LI, Yingrui; CAI, Zhiming; LI, Shenghui; ZHU, Jianfeng; ZHANG, Fan; LIANG, Suisha; ZHANG, Wenwei; GUAN, Yuanlin; SHEN, Dongqian. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, [S.L.], v. 490, n. 7418, p. 55-60, 26 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11450>.

QUÉVRAIN, E; A MAUBERT, M; MICHON, C; CHAIN, F; MARQUANT, R; TAILHADES, J; MIQUEL, S; CARLIER, L; BERMÖDEZ-HUMARÁN, L G; PIGNEUR, B. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. **Gut**, [S.L.], v. 65, n. 3, p. 415-425, 4 jun. 2015. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>.

RAMPELLI, Simone; SOVERINI, Matteo; D'AMICO, Federica; BARONE, Monica; TAVELLA, Teresa; MONTI, Daniela; CAPRI, Miriam; ASTOLFI, Annalisa; BRIGIDI, Patrizia; BIAGI, Elena. Shotgun Metagenomics of Gut Microbiota in Humans with up to Extreme Longevity and the Increasing Role of Xenobiotic Degradation. **Msystems**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 1-9, 28 abr. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/msystems.00124-20>.

RAUTIO, Merja; EEROLA, Erkki; VÄISÄNEN-TUNKELROTT, Marja-Liisa; MOLITORIS, Denise; LAWSON, Paul; COLLINS, Matthew D.; JOUSIMIES-SOMER, Hannele. Reclassification of *Bacteroides putredinis* (Weinberg *et al.*, 1937) in a New Genus *Alistipes* gen. nov., as *Alistipes putredinis* comb. nov., and Description of *Alistipes finegoldii* sp. nov., from Human Sources. **Systematic And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 182-188, jan. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/072320203322346029>.

RAZAVI, Alexander C. *et al.* Sex, gut microbiome, and cardiovascular disease risk. **Biology Of Sex Differences**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-14, 10 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13293-019-0240-z>.

REID, Ann. **The Rare Biosphere**. 2011. Disponível em: <https://asm.org/Reports/The-Rare-Biosphere>. Acesso em: 20 abr. 2021.

REYES, Alejandro; HAYNES, Matthew; HANSON, Nicole; ANGLY, Florent E.; HEATH, Andrew C.; ROHWER, Forest; GORDON, Jeffrey I.. Viruses in the faecal microbiota of

monozygotic twins and their mothers. **Nature**, [S.L.], v. 466, n. 7304, p. 334-338, jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09199>.

RIDAURA, Vanessa K.; FAITH, Jeremiah J.; REY, Federico E.; CHENG, Jiye; DUNCAN, Alexis E.; KAU, Andrew L.; GRIFFIN, Nicholas W.; LOMBARD, Vincent; HENRISSAT, Bernard; BAIN, James R.. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. **Science**, [S.L.], v. 341, n. 6150, p. 1-22, 6 set. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1241214>.

ROBERTSON, Ruairi C.; MANGES, Ameer R.; FINLAY, B. Brett; PRENDERGAST, Andrew J.. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 131-147, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.008>.

ROBLES-VERA, Iñaki; CALLEJO, María; RAMOS, Ricardo; DUARTE, Juan; PEREZ-VIZCAINO, Francisco. Impact of Vitamin D Deficit on the Rat Gut Microbiome. **Nutrients**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 2564-2575, 24 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11112564>.

ROSETO, Jaime A.; KILLER, Jiri; SECHOVCOVÁ, Hana; MRÁZEK, Jakub; BENADA, Oldřich; FLIEGEROVÁ, Kateřina; HAVLÍK, Jaroslav; KOPEČNÝ, Jan. Reclassification of *Eubacterium rectale* (Hauduroy et al. 1937) Prévot 1938 in a new genus *Agathobacter* gen. nov. as *Agathobacter rectalis* comb. nov., and description of *Agathobacter ruminis* sp. nov., isolated from the rumen contents of sheep and cows. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 768-773, 1 fev. 2016. Microbiology Society

SAKAMOTO, Mitsuo; BENNO, Yoshimi. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 56, n. 7, p. 1599-1605, 1 jul. 2006. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64192-0>.

SALOSENSAARI, Aaro; LAITINEN, Ville; HAVULINNA, Aki S.; MERIC, Guillaume; CHENG, Susan; PEROLA, Markus; VALSTA, Liisa; ALFTHAN, Georg; INOUE, Michael; WATROUS, Jeramie D.. Taxonomic signatures of cause-specific mortality risk in human gut microbiome. **Nature Communications**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-8, 11 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22962-y>.

SÁNCHEZ, Ester; PALMA, Giada de; CAPILLA, Amalia; NOVA, Esther; POZO, Tamara; CASTILLEJO, Gemma; VAREA, Vicente; MARCOS, Ascensión; GARROTE, José Antonio; POLANCO, Isabel. Influence of Environmental and Genetic Factors Linked to Celiac Disease Risk on Infant Gut Colonization by *Bacteroides* Species. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 77, n. 15, p. 5316-5323, 3 jun. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00365-11>.

SANTACRUZ, Arlette; MARCOS, Ascensión; WÄRNBERG, Julia; MARTÍ, Amelia; MARTIN-MATILLAS, Miguel; CAMPOY, Cristina; MORENO, Luis A.; VEIGA, Oscar;

REDONDO-FIGUERO, Carlos; GARAGORRI, Jesús M.. Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. **Obesity**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 1906-1915, out. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.112>.

SAVAGE, D. C.. MICROBIAL ECOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 107-133, out. 1977. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.000543>.

SCHER, Jose u *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **Elife**, [S.L.], v. , n. , p. 1-20, nov. 2013. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.01202.001>.

SCHMIDT, Thomas S.B.; RAES, Jeroen; BORK, Peer. The Human Gut Microbiome: from association to modulation. **Cell**, [S.L.], v. 172, n. 6, p. 1198-1215, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.044>.

SCHWIERTZ, Andreas; TARAS, David; SCHÄFER, Klaus; BEIJER, Silvia; BOS, Nicolaas A.; DONUS, Christiane; HARDT, Philip D.. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. **Obesity**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 190-195, jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.167>.

SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. **Cell**, [S.L.], v. 164, n. 3, p. 337-340, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>.

SEPULVEDA, Juan; MOELLER, Andrew H.. The Effects of Temperature on Animal Gut Microbiomes. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. , p. 1-9, 10 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00384>.

SERRANO, Myrna G.; PARIKH, Hardik I.; BROOKS, J. Paul; EDWARDS, David J.; ARODZ, Tom J.; EDUPUGANTI, Laahirie; HUANG, Bernice; GIRERD, Philippe H.; BOKHARI, Yahya A.; BRADLEY, Steven P.. Racioethnic diversity in the dynamics of the vaginal microbiome during pregnancy. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 1001-1011, 29 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0465-8>.

SHANNON, C. E.. A Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 379-423, jul. 1948. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>.

SHAO, Li; LING, Zongxin; CHEN, Deying; LIU, Yufeng; YANG, Fengling; LI, Lanjuan. Disorganized Gut Microbiome Contributed to Liver Cirrhosis Progression: a meta-omics-based study. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. , p. 1-13, 18 dez. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.03166>.

SHERIDAN, Paul O.; DUNCAN, Sylvia H.; WALKER, Alan W.; SCOTT, Karen P.; LOUIS, Petra; FLINT, Harry J.. Objections to the proposed reclassification of *Eubacterium rectale* as

Agathobacter rectalis. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 5, p. 2106-2106, 1 maio 2016. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000969>.

SHIN, Ji-Hee; PARK, Young-Hee; SIM, Minju; KIM, Seong-Ah; JOUNG, Hyojee; SHIN, Dong-Mi. Serum level of sex steroid hormone is associated with diversity and profiles of human gut microbiome. **Research In Microbiology**, [S.L.], v. 170, n. 4-5, p. 192-201, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2019.03.003>.

SHIN, Na-Ri; WHON, Tae Woong; BAE, Jin-Woo. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends In Biotechnology**, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 496-503, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.

SHKOPOROV, Andrei N.; CHAPLIN, Andrei V.; SHCHERBAKOVA, Victoria A.; SUZINA, Natalia E.; KAFARSKAIA, Lyudmila I.; BOZHENKO, Vladimir K.; EFIMOV, Boris A.. Ruthenibacterium lactatiformans gen. nov., sp. nov., an anaerobic, lactate-producing member of the family Ruminococcaceae isolated from human faeces. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 8, p. 3041-3049, 1 ago. 2016. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001143>.

SIMPSON, E. H.. Measurement of Diversity. **Nature**, [S.L.], v. 163, n. 4148, p. 688-688, abr. 1949. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/163688a0>.

SMITS, Samuel A.; LEACH, Jeff; SONNENBURG, Erica D.; GONZALEZ, Carlos G.; LICHTMAN, Joshua S.; REID, Gregor; KNIGHT, Rob; MANJURANO, Alphaxard; CHANGALUCHA, John; ELIAS, Joshua E.. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. **Science**, [S.L.], v. 357, n. 6353, p. 802-806, 25 ago. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aan4834>.

SOKOL, H.; PIGNEUR, B.; WATTERLOT, L.; LAKHDARI, O.; BERMUDEZ-HUMARAN, L. G.; GRATADOUX, J.-J.; BLUGEON, S.; BRIDONNEAU, C.; FURET, J.-P.; CORTHIER, G.. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 105, n. 43, p. 16731-16736, 20 out. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804812105>.

SOKOL, H.; SEKSIK, P.; FURET, J. P.; FIRMESSE, O.; NION-LARMURIER, I.; BEAUGERIE, L.; COSNES, J.; CORTHIER, G.; MARTEAU, P.; DORÉ, J.. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 1183-1189, ago. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20903>.

SONNENBURG, Justin L.; SONNENBURG, Erica D.. Vulnerability of the industrialized microbiota. **Science**, [S.L.], v. 366, n. 6464, p. 1-8, 25 out. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaw9255>.

SONNENBURG, Justin; SONNENBURG, Erica. A Microbiota Assimilation. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 675-677, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2018.10.010>.

STEIMLE, Alex; GRONBACH, Kerstin; BEIFUSS, Brigitte; SCHÄFER, Andrea; HARMENING, Robin; BENDER, Annika; MAERZ, Jan Kevin; LANGE, Anna; MICHAELIS, Lena; MAURER, Andreas. Symbiotic gut commensal bacteria act as host cathepsin S activity regulators. **Journal Of Autoimmunity**, [S.L.], v. 75, n. , p. 82-95, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.07.009>.

STEIMLE, Alex; MICHAELIS, Lena; LORENZO, Flaviana di; KLIEM, Thorsten; MÜNZNER, Tobias; MAERZ, Jan Kevin; SCHÄFER, Andrea; LANGE, Anna; PARUSEL, Raphael; GRONBACH, Kerstin. Weak Agonistic LPS Restores Intestinal Immune Homeostasis. **Molecular Therapy**, [S.L.], v. 27, n. 11, p. 1974-1991, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.07.007>.

STOJANOV, Spase; BERLEC, Aleš; TRUKELJ, Borut. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 1715-1731, 1 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8111715>.

SUN, Zheng; ZHANG, Meng; LI, Min; ZHAO, Jinshan; JI, Youran; CUI, Hongbing; ZHANG, Heping; SUN, Zhihong. Microbial Signature of Ocean-Going Syndrome. **Research Square**, [S.L.], v. , n. , p. 1-18, 31 ago. 2020. Research Square. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-66121/v1>. Disponível em: <https://www.researchsquare.com>. Acesso em: 20 ago. 2021.

SURANA, Neeraj K.; KASPER, Dennis L.. Deciphering the tête-à-tête between the microbiota and the immune system. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 10, n. 124, p. 4197-4203, 18 jul. 2014. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci72332>.

SUZUKI, Taichi A.; WOROBEY, Michael. Geographical variation of human gut microbial composition. **Biology Letters**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 1-5, fev. 2014. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.1037>.

TAKADA, Toshihiko; KURAKAWA, Takashi; TSUJI, Hirokazu; NOMOTO, Koji. Fusicatenibacter saccharivorans gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 63, n. 10, p. 3691-3696, 1 out. 2013. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.045823-0>.

TAKAGI, Tomohisa *et al.* Differences in gut microbiota associated with age, sex, and stool consistency in healthy Japanese subjects. **Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 53-63, 20 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-018-1488-5>.

TANG, Zheng-Zheng; CHEN, Guanhua; ALEKSEYENKO, Alexander V.. PERMANOVA-S: association test for microbial community composition that accommodates confounders and

multiple distances. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 32, n. 17, p. 2618-2625, 19 maio 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btw311>.

TAP, Julien; MONDOT, Stanislas; LEVENEZ, Florence; PELLETIER, Eric; CARON, Christophe; FURET, Jean-Pierre; UGARTE, Edgardo; MUÑOZ-TAMAYO, Rafael; PASLIER, Denis L. E.; NALIN, Renaud. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 2574-2584, out. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x>.

TILG, Herbert; ZMORA, Niv; ADOLPH, Timon E.; ELINAV, Eran. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 40-54, 6 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0198-4>.

TIMS, Sebastian *et al.* Host Genotype and the Effect on Microbial Communities. **Metagenomics Of The Human Body**, [S.L.], v. , n. , p. 15-41, 11 out. 2010. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7089-3_2.

TONG, Xiaolin; XU, Jia; LIAN, Fengmei; YU, Xiaotong; ZHAO, Yufeng; XU, Lipeng; ZHANG, Menghui; ZHAO, Xiyan; SHEN, Jian; WU, Shengping. Structural Alteration of Gut Microbiota during the Amelioration of Human Type 2 Diabetes with Hyperlipidemia by Metformin and a Traditional Chinese Herbal Formula: a multicenter, randomized, open label clinical trial. **Mbio**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 1-12, 5 jul. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.02392-17>.

TURNBAUGH, Peter J.; HAMADY, Micah; YATSUNENKO, Tanya; CANTAREL, Brandi L.; DUNCAN, Alexis; LEY, Ruth E.; SOGIN, Mitchell L.; JONES, William J.; ROE, Bruce A.; AFFOURTIT, Jason P.. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, [S.L.], v. 457, n. 7228, p. 480-484, 30 nov. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07540>.

TURNBAUGH, Peter J.; LEY, Ruth E.; HAMADY, Micah; FRASER-LIGGETT, Claire M.; KNIGHT, Rob; GORDON, Jeffrey I.. The Human Microbiome Project. **Nature**, [S.L.], v. 449, n. 7164, p. 804-810, out. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06244>.

TURNBAUGH, Peter J.; LEY, Ruth E.; MAHOWALD, Michael A.; MAGRINI, Vincent; MARDIS, Elaine R.; GORDON, Jeffrey I.. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, [S.L.], v. 444, n. 7122, p. 1027-1031, dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05414>.

VANDEPUTTE, Doris; FALONY, Gwen; VIEIRA-SILVA, Sara; TITO, Raul y; JOOSSENS, Marie; RAES, Jeroen. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. **Gut**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 57-62, 11 jun. 2015. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309618>.

VANGAY, Pajau; JOHNSON, Abigail J.; WARD, Tonya L.; AL-GHALITH, Gabriel A.; SHIELDS-CUTLER, Robin R.; HILLMANN, Benjamin M.; LUCAS, Sarah K.; BEURA, Lalit K.; THOMPSON, Emily A.; TILL, Lisa M.. US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. **Cell**, [S.L.], v. 175, n. 4, p. 962-972, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.029>.

VIEIRA-SILVA, Sara; FALONY, Gwen; DARZI, Youssef; LIMA-MENDEZ, Gipsi; YUNTA, Roberto Garcia; OKUDA, Shujiro; VANDEPUTTE, Doris; VALLES-COLOMER, Mireia; HILDEBRAND, Falk; CHAFFRON, Samuel. Species–function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 1, n. 8, p. 1-8, 13 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.88>.

VON SCHWARTZENBERG, Reiner Jumpertz; BISANZ, Jordan E.; LYALINA, Svetlana; SPANOGIANNOPOULOS, Peter; ANG, Qi Yan; CAI, Jingwei; DICKMANN, Sophia; FRIEDRICH, Marie; LIU, Su-Yang; COLLINS, Stephanie L.. Caloric restriction disrupts the microbiota and colonization resistance. **Nature**, [S.L.], v. 595, n. 7866, p. 272-277, 23 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03663-4>.

VÄNNI, Petri; TEJESVI, Mysore V.; AINONEN, Sofia; RENKO, Marjo; KORPELA, Katja; SALO, Jarmo; PAALANNE, Niko; TAPIAINEN, Terhi. Delivery mode and perinatal antibiotics influence the predicted metabolic pathways of the gut microbiome. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-14, 1 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-97007-x>.

WAIDMANN, Marc; BECHTOLD, Oliver; FRICK, Julia-Stefanie; LEHR, Hans-Anton; SCHUBERT, Sören; DOBRINDT, Ulrich; LOEFFLER, Jürgen; BOHN, Erwin; AUTENRIETH, Ingo B. *Bacteroides vulgatus* protects against escherichia coli-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 125, n. 1, p. 162-177, jul. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00672-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00672-3).

WANG, Kai; LIAO, Mingfang; ZHOU, Nan; BAO, Li; MA, Ke; ZHENG, Zhongyong; WANG, Yujing; LIU, Chang; WANG, Wenzhao; WANG, Jun. Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. **Cell Reports**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 222-235, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.028>.

WANG, Qi; LI, Fei; LIANG, Bishan; LIANG, Yuhu; CHEN, Sijie; MO, Xiaodong; JU, Yanmei; ZHAO, Hui; JIA, Huijue; SPECTOR, Timothy D.. A metagenome-wide association study of gut microbiota in asthma in UK adults. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 114-121, 12 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1257-x>.

WANG, Yijia; WAN, Xuehua; WU, Xiaojing; ZHANG, Chunze; LIU, Jun; HOU, Shaobin. Eubacterium rectale contributes to colorectal cancer initiation via promoting colitis. **Gut Pathogens**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-11, 12 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13099-020-00396-z>.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J.. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 95, n. 12, p. 6578-6583, 9 jun. 1998. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>.

WHITTAKER, R. H.. EVOLUTION AND MEASUREMENT OF SPECIES DIVERSITY. **Taxon**, [S.L.], v. 21, n. 2-3, p. 213-251, maio 1972. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2307/1218190>.

WHO. **Obesity**. 2021. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1. Acesso em: 07 maio 2021.

WIBOWO, Marsha C.; YANG, Zhen; BORRY, Maxime; HÜBNER, Alexander; HUANG, Kun D.; TIERNEY, Braden T.; ZIMMERMAN, Samuel; BARAJAS-OLMOS, Francisco; CONTRERAS-CUBAS, Cecilia; GARCÍA-ORTIZ, Humberto. Reconstruction of ancient microbial genomes from the human gut. **Nature**, [S.L.], v. 594, n. 7862, p. 234-239, 12 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03532-0>.

WRZOSEK, Laura; MIQUEL, Sylvie; NOORDINE, Marie-Louise; BOUET, Stephan; CHEVALIER-CURT, Marie Joncquel; ROBERT, Véronique; PHILIPPE, Catherine; BRIDONNEAU, Chantal; CHERBUY, Claire; ROBBE-MASSELOT, Catherine. Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. **Bmc Biology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-13, 21 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7007-11-61>.

WU, Gary D. *et al.* Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, [S.L.], v. 334, n. 6052, p. 105-108, 7 out. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1208344>.

XIE, Hailiang; GUO, Ruijin; ZHONG, Huanzi; FENG, Qiang; LAN, Zhou; QIN, Bingcai; WARD, Kirsten J.; JACKSON, Matthew A.; XIA, Yan; CHEN, Xu. Shotgun Metagenomics of 250 Adult Twins Reveals Genetic and Environmental Impacts on the Gut Microbiome. **Cell Systems**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 572-584, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cels.2016.10.004>.

XIE, Xiao-Qian; GENG, Yan; GUAN, Qijie; REN, Yilin; GUO, Lin; LV, Qiqi; LU, Zhen-Ming; SHI, Jin-Song; XU, Zheng-Hong. Influence of Short-Term Consumption of *Hericium erinaceus* on Serum Biochemical Markers and the Changes of the Gut Microbiota: a pilot study. **Nutrients**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 1008-1020, 21 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13031008>.

YATSUNENKO, Tanya *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, [S.L.], v. 486, n. 7402, p. 222-227, 9 maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11053>.

YOSHIDA, Naofumi; EMOTO, Takuo; YAMASHITA, Tomoya; WATANABE, Hikaru; HAYASHI, Tomohiro; TABATA, Tokiko; HOSHI, Namiko; HATANO, Naoya; OZAWA, Genki; SASAKI, Naoto. Bacteroides vulgatus and Bacteroides dorei Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. **Circulation**, [S.L.], v. 138, n. 22, p. 2486-2498, 27 nov. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.118.033714>.

ZEYBEL, Mujdat; ARIF, Muhammad; LI, Xiangyu; ALTAY, Ozlem; SHI, Mengnan; AKYILDIZ, Murat; SAGLAM, Burcin; GONENLI, Mehmet Gokhan; YIGIT, Buket; ULUKAN, Burge. Multi-omics analysis reveals the impact of microbiota on host metabolism in hepatic steatosis. **Medrxiv**, [S.L.], v. , n. , p. 1-10, 23 maio 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.05.22.21257482>. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.05.22.21257482v1.article-info>. Acesso em: 20 jun. 2021.

ZHANG, Chenhong; ZHAO, Liping. Strain-level dissection of the contribution of the gut microbiome to human metabolic disease. **Genome Medicine**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-10, 20 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0304-1>.

ZHANG, H. *et al.* Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 106, n. 7, p. 2365-2370, 21 jan. 2009. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0812600106>.

ZHANG, Ting; LI, Qianqian; CHENG, Lei; BUCH, Heena; ZHANG, Faming. Akkermansia muciniphila is a promising probiotic. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 1109-1125, 21 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13410>.

ZHOU, Youlian; XU, Haoming; XU, Jing; GUO, Xue; ZHAO, Hailan; CHEN, Ye; ZHOU, Yongjian; NIE, Yuqiang. F. prausnitzii and its supernatant increase SCFAs-producing bacteria to restore gut dysbiosis in TNBS-induced colitis. **Amb Express**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-10, 28 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-021-01197-6>.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil do microbioma intestinal humano com dados de metagenoma em brasileiros

Pesquisador: ILÍADA RAINHA DE SOUZA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 28269120.3.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.970.939

Apresentação do Projeto:

"Perfil do microbioma intestinal humano com dados de metagenoma em brasileiros". Projeto de pesquisa da Profa. Dr^a Ilíada Rainha de Souza (UFSC/CCB/BEG/PPGBCD) no qual está inserido a Dissertação de Mestrado de Jeanine Schütz Cardoso Teófilo. Este trabalho faz parte de uma "cooperação técnica" entre o Laboratório de Polimorfismos Genéticos da Universidade Federal de Santa Catarina (LAPOGE/CCB/UFSC) e o Laboratório Biogenetika (empresa privada). Serão analisados os resultados disponibilizados pela empresa parceira que realizou previamente a coleta das amostras de fezes, o processamento das amostras para sequenciamento do genoma e as leituras dos genomas sequenciados para análise, com identificação dos microbiontes. Os participantes voluntários foram esclarecidos quanto a possibilidade de uso de seus dados para a pesquisa e assegurados do sigilo das informações pessoais e do anonimato, assinando na sequência o Termo de Consentimento Livre Esclarecido elaborado e mantido exclusivamente pela Biogenetika, que é a empresa parceira. Todos os dados pessoais que possam identificar ou caracterizar de forma pessoal os indivíduos serão mantidos exclusivamente pela Biogenetika®, sendo que apenas os resultados anônimos serão disponibilizados para a presente pesquisa. Os indivíduos participantes do estudo não foram padronizados, sendo que os mesmos procuraram a empresa parceira de forma voluntária para

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.970.939

realizar seu teste de microbioma individual. Portanto, este estudo compreende indivíduos saudáveis ou com alguma condição de saúde específicos que serão descritos e considerados durante o presente projeto. Com este projeto pretende-se identificar a diversidade, quantificar a riqueza e abundância das espécies de microorganismos que habitam o intestino humano na população brasileira a partir de amostras já coletadas e analisadas através da identificação genômica utilizando tecnologia de WGS-shotgun.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar e caracterizar a riqueza e abundância do microbioma intestinal humano na população brasileira, e estabelecer relações entre o microbioma e parâmetros individuais e ambientais. Os dados genômicos foram produzidos com a utilização da tecnologia de Whole Genome Sequencing Shotgun (WGS-shotgun) e os dados individuais coletados em questionário estruturados, que foram disponibilizados para o trabalho.

Objetivo Secundário:

- Identificar a diversidade das espécies de microrganismos que habitam o intestino humano a partir de amostras de fezes de indivíduos saudáveis ou com alguma condição específica de saúde;
- Quantificar a riqueza e abundância da microbiota intestinal humana a partir da análise do microbioma e metagenoma;
- Relacionar a presença, riqueza e abundância da microbiota intestinal com os dados dos indivíduos coletados, tais como: idade, sexo, profissão, peso, altura, dieta, consumo ou não de bebidas alcoólicas, vícios, uso de medicamentos, uso de suplementos, uso de probióticos, atividade física e o tipo de nascimento (parto normal ou cesariana).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto de pesquisa não representa riscos à saúde dos indivíduos participantes.

Benefícios:

Até o momento há uma dezena de estudos da composição do microbioma intestinal humano na população brasileira que relacionem a questões de saúde e doença e em especial pela metodologia

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.970.939

de sequenciamento por Whole Genome Sequencing Shotgun (WGS-shotgun) frente aos avanços do assunto em nível mundial põe urgência nas pesquisas sobre o tema, cada vez mais relevante em todos os âmbitos da área da saúde. Independentemente de o microbioma alterado ser uma causa ou consequência da doença, ou mais provavelmente um fator de risco ambiental ou modulador, está se tornando claro que o microbioma fornece biomarcadores que poderiam ser testados quanto ao risco ou presença de alterações que podem levar ao desenvolvimento de determinadas patologias. Estudos estão sendo conduzidos para explorar as ligações plausíveis de doenças e a composição do microbioma e esforços estão sendo feitos para entender como o microbioma varia com o estilo de vida, genética, idade, nutrição, medicação e ambiente do hospedeiro. No Mapa do microbioma internacional disponível até o presente momento o Brasil ainda não está representado. Portanto é de alta relevância realizar estudos para comparar a microbiota de indivíduos da população brasileira com diferentes hábitos alimentares e estilos de vida. Conhecer o metagenoma e a relação com os hábitos de vida, devido a clara importância que o mesmo tem, tanto para o funcionamento do organismo humano, como pode servir de biomarcador para diagnóstico precoce e preciso de doenças humanas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa entre a UFSC/PPGBCD e a empresa BIOGENETIKA, coordenada pela Profa. Dr^a Iliada Rainha de Souza no qual está inserido uma Dissertação de Mestrado. Com este projeto pretende-se identificar a diversidade, quantificar a riqueza e abundância das espécies de micro-organismos que habitam o intestino humano na população brasileira a partir de amostras já coletadas e analisadas através da identificação genômica utilizando tecnologia de WGS-shotgun. E ainda estabelecer possíveis relações entre o microbioma e alguns parâmetros, como idade, sexo, IMC, estados de saúde/doença ou fatores ambientais cruzando as análises com dados coletados em questionário já realizado. Os participantes voluntários foram esclarecidos quanto a possibilidade de uso de seus dados para a pesquisa e assegurados do sigilo das informações pessoais, assinando na sequência o Termo de Consentimento Livre Esclarecido elaborado e mantido pela Biogenetika. Serão analisados os resultados anônimos disponibilizados pela empresa parceira que realizou previamente a coleta das amostras de fezes, o processamento das amostras para leitura do genoma e as leituras dos genomas obtidos para análise. O tema tem relevância científica, a ausência do TCLE foi devidamente. Desta forma, recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos obrigatórios:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.970.939

- 1) PB - INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO;
- 2) Termo de confidencialidade de dados e anonimato;
- 3) Projeto de pesquisa;
- 4) folha de rosto (assinada pela Coordenadora do PPGBCD).

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1480815.pdf	30/03/2020 18:14:48		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_FINAL.pdf	30/03/2020 18:13:57	JEANINE SCHUTZ CARDOSO TEOFILO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Ausencia.pdf	23/01/2020 07:34:36	JEANINE SCHUTZ CARDOSO TEOFILO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Perfil_Microb_PlatBrasil.pdf	16/01/2020 10:21:37	JEANINE SCHUTZ CARDOSO TEOFILO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 14 de Abril de 2020

Assinado por:
Nelson Canzian da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO B



Para microbioma

**Resumo e explicação do kit:**

O OMNigene-GUT fornece os materiais e instruções para coleta e estabilização de DNA microbiano de uma amostra fecal.

Alertas e precauções:

- APENAS PARA USO EXTERNO.
- NÃO remova a parte superior amarela do tubo.
- NÃO derrame o líquido estabilizante no tubo.
- Lave com água se o líquido entrar em contato com os olhos ou com a pele. NÃO ingerir.
- Se estiver coletando amostra fecal líquida, consulte as instruções ao usuário fornecidas separadamente.
- Pequenos itens podem representar risco de engasgamento.

Armazenamento: 15 °C a 25 °C

Enviar de acordo com os regulamentos aplicáveis ao transporte de materiais biológicos. Consulte a MSDS em www.dnagenotek.com

Legenda das etiquetas:

- Coletar a amostra até (data de validade)
- Nº do catálogo
- Fabricante
- Instruções de armazenamento
- Cuidado: consulte as instruções de uso
- Número de lote

INSTRUÇÕES DE USO

Leia todas as instruções antes da coleta

Procedimento:

- 1 PREPARAÇÕES IMPORTANTES:**

 - Esvazie a bexiga antes de iniciar a coleta.
 - Colete amostra fecal livre de urina ou água do vaso sanitário.
 - Papel higiênico ou lenços podem ser necessários.
- 2** Enquanto segurar a parte superior amarela do tubo, solte APENAS o tampão roxo e coloque-o de lado para uso posterior.

IMPORTANTE: NÃO remova a parte superior amarela do tubo. NÃO derrame o líquido estabilizante no tubo.
- 3** Utilize a espátula para coletar uma pequena amostra de amostra fecal.

Tamanho real de amostra fecal.
- 4** Transfira a amostra fecal para a parte superior amarela do tubo. Repita até que a amostra preencha a parte superior amarela do tubo.

IMPORTANTE: NÃO pressione a amostra para dentro do tubo.
- 5** Raspe horizontalmente por toda a parte superior do tubo para nivelar a amostra e remover qualquer excesso.

Limpe a parte exterior e superior do tubo com um papel higiênico ou lenço caso seja necessário.
- 6** Pegue o tampão roxo com a extremidade sólida para baixo e aperte-o na parte superior amarela do tubo até que esteja fechado firmemente.
- 7** Agite o tubo lacrado com força e rapidez em movimento para frente e para trás por no mínimo 30 segundos.
- 8** A amostra fecal será misturada com o líquido estabilizador no tubo; nem todas as partículas serão dissolvidas.

IMPORTANTE: continue a agitar caso grandes partículas permaneçam, como exibido na Figura A.
- 9** Coloque a espátula na embalagem original ou enrole-a em papel higiênico e descarte-a no lixo.

IMPORTANTE: Envie a amostra para processamento seguindo as instruções de entrega fornecidas separadamente pelo fornecedor do kit.

DNAgenotek

Foto no Canadá
 DNA Genotek Inc.
 3000 - 500 Palladium Drive
 Ottawa, ON, Canadá K2V 1C2

Amostras superiores
Desempenho comprovado

Tel: +1.613.723.5757
 Fax: +1.613.723.5707
 info@dnagenotek.com
 www.dnagenotek.com

OMNigene-GUT (OM-202) não está à venda nos Estados Unidos.

OMNigene-GUT (OM-202) destina-se exclusivamente para uso em pesquisas.

*OMNigene é marca registrada da DNA Genotek Inc.

Alguns produtos da DNA Genotek podem não estar à venda em todas as regiões geográficas, entre em contato com seu representante de vendas para obter mais informações. Todos os protocolos, livros brancos e descrições de uso da DNA Genotek estão disponíveis na seção de suporte de nosso site: www.dnagenotek.com.

Patente (www.dnagenotek.com/legal/notices)

© 2018 DNA Genotek Inc., uma subsidiária da OraSue Technologies, Inc. Todos os direitos reservados.
 PD-FR-00480 BZ - Portuguese Issue 4/2018-09

APÊNDICE 1 - ÍNDICES DE DIVERSIDADE

ÍNDICES DE DIVERSIDADE ALFA

Quando se estuda a diversidade de uma comunidade, o pesquisador se depara com o problema de como representar a “real” diversidade da comunidade analisada. A razão entre o número de tipos de organismos observados aumenta com os esforços de amostragem realizados, e este padrão pode ser visualizado traçando uma curva de abundância de classificação. Como todas as comunidades possuem um número finito de espécies, quanto mais côncava para baixo for a curva, melhor será a amostra da comunidade. Isso pode ser observado tanto para macro como para microrganismos, portanto os mesmos índices podem ser utilizados para ambos (HUGHES, 2001).

Os índices, comumente utilizados em estudos de ecologia na medição da diversidade, visam descrever as propriedades gerais das comunidades, permitindo a comparação entre diferentes amostras, além de permitir a verificação das mudanças relacionadas a gradientes bióticos, abióticos, perturbações, produtividade, área e heterogeneidade de recursos (HUGHES, 2001; MORRIS et al, 2014), embora não haja consenso sobre quais índices são mais adequados e informativos (MORRIS et al, 2014). Normalmente combinam a avaliação de dois aspectos separados da diversidade: riqueza e uniformidade.

Diversas abordagens estatísticas foram desenvolvidas para comparar e estimar a riqueza de espécies a partir de amostras de macroorganismos, e algumas foram convertidas para os estudos de diversidade de microrganismos, como, por exemplo, a rarefação, e os diferentes estimadores de riqueza (extrapolação de curvas de acumulação, estimadores paramétricos e não paramétricos). Os estimadores não paramétricos mostram uma promessa particular para dados microbianos e, em alguns habitats, podem exigir tamanhos de amostra de apenas 200 a 1.000 clones para detectar diferenças de riqueza de apenas dezenas de espécies (HUGHES, 2001).

A Riqueza (S) (WHITTAKER, 1972) é a métrica mais simples usada para representar a diversidade, e é a mais sensível às espécies raras (MORRIS et al, 2014). Refere-se ao número de diferentes espécies presentes. Quanto maior o número de tipos, mais diversificada é a amostra em termos de riqueza. Por outro lado, a uniformidade se refere à porcentagem relativa distribuída entre os diferentes tipos analisados (ex. Espécies). Quanto mais equitativa for essa distribuição, mais diversa será a amostra em termos de uniformidade (NAGENDRA, 2002).

Para estimar a riqueza (S) utilizamos a abordagem não paramétrica de Chao1 (CHAO, 1984), que é definida pela seguinte fórmula:

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + n_1^2/2n_2$$

Onde S_{obs} é o número de espécies observadas, n_1 é o número de espécies capturadas apenas uma vez, e n_2 é o número de espécies capturadas duas vezes. Este índice é útil para conjunto de dados inclinados à baixa abundância, como o caso dos microorganismos (HUGHES, 2001; CHAO, 1984).

Em uma comunidade muito diversa, a probabilidade de que uma espécie seja observada mais de uma vez será baixa, e a maioria das espécies será representada apenas por um indivíduo em uma amostra. Em uma comunidade empobrecida, a probabilidade de que uma espécie seja observada mais de uma vez será maior, e muitas espécies serão observadas várias vezes em uma amostra (HUGHES, 2001).

A abundância de espécies também é importante para a diversidade, e a abundância proporcional das espécies pode ser incorporada em índices que representam a diversidade, como é o caso da dominância. O mais simples desses índices foi proposto por Berger e Parker (1970), e representa a proporção máxima de qualquer espécie em uma amostra. A dominância é um índice que utiliza a proporcionalidade para definir a diversidade. Tem uma relação analítica com a série geométrica do modelo de abundância de espécies, e relata a abundância proporcional apenas das espécies mais abundantes na população (MORRIS et al, 2014).

Alguns índices compostos combinam medidas de riqueza e abundância. Em primeiro lugar estão os índices de diversidade de Shannon (H), cujos valores variam em teoria de 0 a infinito, e de diversidade de Simpson (D1), que produz valores de 0 a 1. Estes índices diferem em sua fundamentação teórica e interpretação (MORRIS et al, 2014; KIM, 2017).

Diversidade de Shannon (H) é representado pela fórmula:

$$-\sum P_i \ln(P_i)$$

Diversidade de Simpson (D1) é representado pela fórmula:

$$1/\sum P_i^2$$

A Diversidade de Shannon (H) tem seus fundamentos na teoria da informação e representa a incerteza sobre a identidade de um indivíduo desconhecido. Em um sistema altamente diverso (e uniformemente distribuído), um indivíduo desconhecido poderia pertencer a qualquer espécie, levando a uma grande incerteza nas previsões de sua identidade. Em um sistema menos diverso, dominado por uma ou algumas espécies, é mais fácil prever a identidade de indivíduos desconhecidos e há menos incerteza no sistema. Esta lógica é muito utilizada na literatura ecológica, apesar de sua conceituação abstrata (SHANNON, 1948; MORRIS et al, 2014; KIM, 2017). Quanto à sensibilidade deste índice, há contradições na literatura. Nagendra (2002) afirma que o índice de Shannon enfatiza o componente de riqueza e tem maior sensibilidade a tipos raros (espécies mais raras) e, portanto, pode receber maior importância durante a interpretação quando este for o objetivo pretendido. Já Morris et al. (2014) refere que a Diversidade Shannon é igualmente sensível a espécies raras e abundantes, sendo que a sensibilidade a espécies raras aumenta com a diminuição de 1, e a sensibilidade a espécies abundantes aumenta com o aumento de 1.

A Diversidade Simpson (D1) representa a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente pertençam a espécies diferentes (SIMPSON, 1949; NAGENDRA, 2002).

Há ainda a Dominância de Simpson (InvSimpson) que está estreitamente relacionada a D1, sendo o inverso do índice original de Simpson. Ambas as transformações servem para fazer o índice aumentar à medida que a diversidade aumenta intuitivamente, e, embora ambas sejam usadas, D2 é mais comum (MORRIS et al., 2014). Os índices de Simpson conferem maior ênfase ao componente de uniformidade (mudanças na abundância proporcional) e aos tipos de cobertura dominantes (espécies mais comuns, abundantes). Quando apenas o dominante é de interesse, o índice de diversidade de Simpson pode ser preferido (NAGENDRA, 2002).

Dominância de Simpson (D2) é representada pela fórmula:

$$1/\sum P_i^2$$

A Uniformidade representa o grau em que os indivíduos são divididos entre as espécies, sendo que os valores baixos indicam que uma ou algumas espécies dominam, e valores altos indicam que números relativamente iguais de indivíduos pertencem a cada espécie (MORRIS et al,

2014). A maioria dos índices de diversidade, portanto, tem um índice de uniformidade análogo. O índice de uniformidade de Shannon se refere ao valor observado da diversidade de Shannon dividido pela diversidade máxima possível para um local com o mesmo número de tipos. Da mesma forma, o índice de uniformidade de Simpson se refere ao valor observado da diversidade de Simpson dividido pela diversidade máxima possível para um local, dada a mesma riqueza de tipo de interesse. À medida que esses índices se aproximam de 1, a paisagem se aproxima da uniformidade perfeita, ou seja, uma distribuição perfeitamente igual da terra entre os tipos de cobertura (NAGENDRA, 2002).

A uniformidade não é calculada de forma independente, mas sim derivada de medidas de diversidade compostas, como H, D1 e D2, uma vez que contêm componentes de riqueza e uniformidade. A Uniformidade de Simpson (E) calculada a partir de D2, é matematicamente independente de D1 (MORRIS et al, 2014).

Se estabelecermos um ‘continuum’ entre os índices para estabelecer a sensibilidade quanto à identificação de espécies raras até mais abundantes, podemos colocar S, H, D1, D2, Dominância de Berger-Parker e E, respectivamente. Se se espera que os efeitos sejam mais aparentes em espécies/característica dominante, então S seria apropriado. No entanto, se as espécies/características dominantes são esperadas para serem mais importantes, então D1, D2 e BP seriam mais apropriados. H pode ser usado em situações em que se espera que espécies/características raras e abundantes sejam igualmente importantes. A comparação de alguns índices cuidadosamente escolhidos pode aumentar muito a compreensão dos componentes complexos que impulsionam a diversidade (MORRIS et al, 2014).

Para avaliar o microbioma alguns aspectos taxonômicos da biodiversidade, incluindo riqueza de espécies (S), similaridade em abundância entre as espécies (uniformidade), concentração de números de indivíduos em uma assembléia entre espécies de abundância relativamente baixa (raridade), e número de indivíduos pertencentes às espécies mais abundantes (dominância absoluta) são fundamentais (LOCEY; LENNON, 2016).

A diferença entre dois perfis de composição microbiana pode ser motivada pela mudança na riqueza de espécies, uniformidade ou uma combinação das duas. Riqueza e uniformidade são os dois principais fatores que descrevem a diversidade de espécies em comunidades microbianas. Cada uma dessas medidas aborda um aspecto diferente da ecologia da comunidade; assim, ao considerá-los juntos, uma imagem muito mais perspicaz da estrutura da

comunidade é fornecida. Riqueza e uniformidade aumentadas são frequentemente associadas a ecossistemas mais estáveis e estabelecidos por mais tempo. Tais ecossistemas tendem a ser resistentes às pressões ambientais, como dieta, uso de antibióticos e invasão de patógenos (TANG et al, 2016).

As análises do microbioma são muito propensas à má interpretação. Por exemplo, é impossível inferir o crescimento ou a decomposição de microorganismos puramente com base em dados de abundância relativa, porque o crescimento de uma espécie também poderia ser explicado pelo declínio de todas as outras espécies (GILBERT et al., 2016).

A detecção consistente de muitos grupos raros, na maioria das assembleias microbianas pode ter implicações fundamentais e práticas significativas, e sugere que eles têm um papel a desempenhar na dinâmica da comunidade microbiana. Eles podem realizar funções fisiológicas fundamentais, manter funções no nível da comunidade em face das mudanças ambientais ou servir como reservatório de recursos genéticos que podem fornecer material novo para a comunidade, conforme necessário. Em geral, sequenciamento mais intensivo ou "profundo" do que é típico de análise de comunidade microbiana, e amostragem repetida ao longo do tempo, provavelmente, serão necessários para uma melhor captura dinâmica da comunidade e para explorar a estabilidade temporal da rara biosfera (REID; BUCKLEY, 2011; LOCEY; LENNON, 2016). A detecção dos grupos raros é subdividida em três níveis: aqueles que não fazem parte do microbioma central, os que possuem baixa abundância (0,2/100) e aqueles que são raros (0,1/100) (LAHTI et al., 2017).

DIVERSIDADE BETA

As análises de beta-diversidade foram realizadas utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957). A distância de Bray-Curtis é definida como a diferença da abundância dividida pela abundância total contribuída por ambas as amostras (TANG et al., 2016). A diversidade beta mede quão diferentes dois vetores de composição são em geral, em vez de em relação a um único táxon. Para “n” casos e “m” não casos, calcula-se a matriz simétrica $(n + m) \times (n + m)$ cujos elementos fora da diagonal são as dissimilaridades de pares entre as amostras do microbioma (GAIL; WAN; SHI, 2021).

Embora os métodos baseados na distância forneçam ferramentas poderosas para descobrir associações entre a composição do microbioma e as covariâncias, eles sofrem de duas

limitações principais. Em primeiro lugar, os testes baseados em distância, existentes, não podem lidar com fatores de confusão, que são definidos como variáveis correlacionadas com as covariáveis de interesse e a composição do microbioma. Estender esses métodos para acomodar resultados e desenhos de estudo mais sofisticados na presença de fatores de confusão é um desafio. Tratar fatores de confusão como covariáveis, ou omitir os fatores de confusão no teste baseado em distância, distorce a verdadeira associação. Conseqüentemente, a capacidade de modelar e ajustar adequadamente os fatores de confusão torna-se extremamente importante. Em segundo lugar, os testes baseados em distância existentes não podem incorporar simultaneamente várias distâncias. Como a biologia subjacente é desconhecida a priori, a distância selecionada é provavelmente subótima e pode não render um bom poder estatístico. Pesquisar distâncias múltiplas e relatar aquele que produz o menor valor P é muito liberal, e produz descobertas falsas em excesso, a menos que ajustes sejam feitos para comparações múltiplas. Por outro lado, os ajustes para comparações múltiplas podem resultar em baixa potência, quando um número excessivo de distâncias é testado. Portanto, é altamente desejável ter um teste unificado que combine várias distâncias (TANG et al, 2016).

Para ver se as dissimilaridades entre os grupos são significativamente maiores do que as dissimilaridades dentro dos grupos, uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) pode ser realizada (GAIL; WAN; SHI, 2021).

ÍNDICE DE SAÚDE DO MICROBIOMA INTESTINAL (GMHI)

Um desafio adicional ao gerenciamento de ecossistemas é identificar as características dentro deste que são “benéficas” e, portanto, escolhidas para a conservação. Uma estratégia usada por ecologistas é avaliar os “serviços” fornecidos pelo ecossistema. Os serviços ecossistêmicos, popularizados na Avaliação Ecossistêmica do Milênio, permitem que valor seja atribuído a diferentes componentes do mesmo. Por exemplo, se um lago fornece água potável e recreação (natação, pesca), a poluição desse lago colocaria esses serviços em risco. Da mesma forma, podemos considerar os serviços ecossistêmicos fornecidos pela microbiota intestinal. No entanto, determinar se um serviço ecossistêmico da microbiota é benéfico torna-se difícil o suficiente, por si só. E estabelecer se esse benefício é universal ou específico para uma subpopulação de pessoas ou mesmo apenas um indivíduo, um período de desenvolvimento da vida, ou durante uma doença

ou a reprodução aumenta a complexidade. Podemos citar como exemplo a extração de calorias, que se mostrava um importante serviço da microbiota, prestado no mundo pré-industrializado, mas que, ao comer alimentos modernos e ricos em calorias, esse serviço se torna menos importante (SONNENBURG; SONNENBURG, 2019).

Desenvolvido por Gupta et al. (2020), especificamente para estudos de microbioma intestinal humano, o Índice de Saúde do Microbioma Intestinal (GMHI, do inglês Gut Microbiome Health Index) é robusto para avaliar o estado de saúde (grau de presença/ausência de doença diagnosticada) com base no perfil taxonômico em nível de espécie, a partir de uma amostra de fezes processada por metagenoma de espingarda (Whole Genome.Shotgun).

O GMHI é uma fórmula matemática biologicamente interpretável para prever a probabilidade de doença, independentemente do diagnóstico clínico. Por meio de um estudo múltiplo, com análise integrativa de 4347 metagenomas de fezes humanas, de 34 estudos publicados em condições saudáveis, e 12 diferentes condições não saudáveis (doença ou peso corporal anormal), conseguiram identificar espécies que são mais frequentemente observadas em grupos saudáveis em comparação com os não saudáveis, e ajustaram os parâmetros para uma fórmula pré-definida para classificação. Foram consideradas “presentes” as espécies até a abundância relativa de $1,0 \times 10^{-5}$.

Identificaram 50 espécies com estas relações, sendo 7 como indicadoras de saúde e 43 como de escassez de saúde. As espécies indicadoras de saúde foram *Alistipes senegalensis*, *Bacteroidales bacterium-ph8*, *Bifidobacterium adolescentes*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Lachnospiraceae bacterium-8-1-57FAA* e *Suterella wadsworthensis*. Os valores do índice GMHI podem variar de -6 até 6, sendo que valores mais altos estão fortemente associados às amostras saudáveis utilizadas no estudo, e os valores menores associados às amostras de indivíduos com condições de ausência de saúde.

Gupta e seus et al. (2020) afirmam que o GMHI distingue melhor os grupos saudáveis de não saudáveis do que os índices ecológicos (por exemplo, diversidade e riqueza de Shannon) geralmente considerados como marcadores de saúde intestinal e disbiose