



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA CARLA HENRIQUE

**IMPACTO DA INGESTÃO DE *Lactobacillus plantarum* Lp-115  
SOBRE A MICROBIOTA FECAL HUMANA**

---

Londrina  
2014

FERNANDA CARLA HENRIQUE

**IMPACTO DA INGESTÃO DE *Lactobacillus plantarum* Lp-115  
SOBRE A MICROBIOTA FECAL HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena da Silva Miglioranza.

Co-orientador: Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

H519i Henrique, Fernanda Carla.  
Impacto da ingestão de *Lactobacillus plantarum* Lp-115 sobre a microbiota fecal humana / Fernanda Carla Henrique. – Londrina, 2014.  
120 f. : il.

Orientador: Lucia Helena da Silva Miglioranza.

Coorientador: Laurival Antônio Vilas-Boas.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2014.

Inclui bibliografia.

1. *Lactobacillus plantarum* – Teses. 2. Probióticos – Teses. 3. Leite fermentado – Teses. 4. Microbiota fecal humana – Teses. I. Miglioranza, Lucia Helena da Silva. II. Vilas-Boas, Laurival Antônio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641

FERNANDA CARLA HENRIQUE

**IMPACTO DA INGESTÃO DE *Lactobacillus plantarum* Lp-115 SOBRE A  
MICROBIOTA FECAL HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena Silva  
Miglioranza  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

---

Profa. Dra. Giselle A. Nobre Costa  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

---

Profa. Dra. Gislayne F. Trindade Vilas-Bôas  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de março de 2014.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu Senhor e Salvador, por me criar, amar e ser tão bondoso. Nesse período fui desafiada a confiar em Sua soberania sobre a minha vida e, embora eu esteja no processo, tem sido maravilhoso experimentar a dependência de um Pai perfeito.

Aos meus amados pais, **Dionísia e Henrique**, por terem me sustentado em todos os sentidos, pela dedicação, confiança e amor depositados em mim. Agradeço em especial à minha mãe, por ser a melhor amiga que eu poderia ter, minha grande motivação e fortaleza. A você, ‘fofinha’, dedico esse trabalho.

Aos meus irmãos, **Guilherme e Eduardo**, por serem minha inspiração. Enquanto tenho lições diárias de disciplina e caráter com o mais novo; o mais velho, de tão longe, me ensina a importância do trabalho e da família.

Ao meu ‘amor amado’, **Luiz Bana**, por seu apoio e tolerância ilimitados, por seu incentivo e valorização. Obrigada por caminhar junto comigo, me alegrar durante essa caminhada e cuidar tanto de mim. Tenho batalhado por nossos sonhos e sei que esse é apenas o começo...

À professora **Lucia** pela orientação, suporte e por ter me presenteado com a continuação desse projeto. Obrigada por aceitar a tecnóloga cheia de inseguranças. Agradeço também pela transmissão de força e confiança.

Ao casal Vilas-Boas, **Laurival e Gislayne**, por todo o conhecimento e apoio que me proporcionaram. Só posso agradecer por vocês serem tão humanos e humildes. Obrigada pela atenção, paciência em ensinar e por todo o incentivo durante esses dois anos. Minha sincera gratidão, pois vocês fizeram essa etapa da minha vida ser mais leve e prazerosa.

À querida **Giselle**, responsável por esse trabalho, por ter me auxiliado sempre com simpatia e presteza. Obrigada por todas as dicas, palavras de encorajamento e entusiasmo.

À **Raissa** que desde os tempos de IC me ensina a cultivar bactérias e a ser mais concentrada e organizada. Obrigada por sua amizade e doçura.

Ao **Ivan** por ter submetido nossos dados e me “socorrido” com os diferentes formatos de arquivo. Obrigada pelo apoio e e-mails incentivadores.

Aos biólogos, agrônomos e biomédicos do laboratório de genética, **Fernanda, Josiane, Ana Paula, Priscilla, Kelly, Janaína, Amanda e André** por terem me acolhido tão bem, pelos bons momentos que passamos juntos e por terem me ensinado, entre tantas outras coisas, o significado de Bt.

Aos MGBs, meus amigos mestrandos que me acompanham desde a faculdade, **Bruna, Rodolfo, Thanise e Naiara**, pela cumplicidade e por estarem sempre presentes. Além do trio inesquecível **Melina, Marcela e Fernando** que conheci há apenas dois anos, mas que compartilharam seus sorrisos, sonhos e votos de confiança.

Aos irmãos da minha célula, **Fernanda Mazer, Larissa, Laiana, Maryanna, Filipe, Gabriel, Tiago e William**, por estarem ao meu lado em todas as dificuldades e alegrias e por orarem por questões variadas, desde a prova do mestrado até para que a reação de PCR não fosse contaminada. Obrigada por serem tão especiais.

Às lindas bailarinas da PPJ, em especial minha professora **Leandra Cabral**, pelo carinho de tantos anos e por ser tão paciente. Obrigada por me passar as coreografias perdidas nos dias em que eu ficava até às 22h no laboratório. Não posso esquecer das minhas aluninhas pela compreensão nos momentos de ausência e por me motivarem, semanalmente, a ser uma pessoa e líder melhor.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em especial ao Dr. **Juscélio Cardoso** e Dra. **Diva Andrade** pelo sequenciamento de nossas amostras, além das importantes contribuições do primeiro no exame de qualificação.

Aos **professores** e equipe do Departamento de Ciência de Alimentos (DCTA) pelos conhecimentos e experiências compartilhadas, em especial à sempre disposta **Sandra Rezende**.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Enfim, aos meus familiares e a todos que participaram dessa trajetória... **Muito obrigada**.

***Bíblia sagrada***

**Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;  
glória, pois, a Ele eternamente. Amém.**

Romanos 11:36

HENRIQUE, Fernanda Carla. **Impacto da ingestão de *Lactobacillus plantarum* Lp-115 sobre a microbiota fecal humana**. 2014. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

A 'microbiota intestinal' refere-se ao ecossistema essencialmente bacteriano que reside ou está de passagem pelo trato gastrointestinal humano, sendo considerada um dos maiores determinantes do estado de saúde e/ou doença. Microrganismos probióticos, reconhecidos por modular a microbiota intestinal, são particularmente associados a efeitos benéficos a saúde do hospedeiro. Evidências revelam que probióticos atuam por intermédio do impacto direto ou indireto sobre os componentes da microbiota intestinal. Entre as bactérias do ácido láctico, o *Lactobacillus plantarum* tem sido muito utilizado em estudos clínicos, como promotor de efeitos benéficos ao hospedeiro, no entanto, o seu impacto sobre a composição da microbiota fecal humana é pouco explorado. Em estudo preliminar, um leite fermentado por *L. plantarum* Lp-115 foi introduzido na dieta de indivíduos adultos e saudáveis. Na presente investigação, amostras fecais de dois voluntários relativas ao tempo zero da terapia probiótica foram comparadas com amostras referentes ao período de consumo (90 dias) e pós-consumo de maneira a avaliar alterações no balanço microbiano de dois voluntários. A comparação ocorreu por meio da caracterização dos constituintes da microbiota fecal desses indivíduos. Para isso, uma região variável do gene 16S RNA ribossomal foi amplificada e sequenciada a partir do DNA fecal total dos sujeitos utilizando a plataforma Ion Torrent e os dados interpretados pelo servidor Metagenomics-RAST. No período anterior ao consumo, foram detectados membros de 15 filos do domínio *Eubacteria* (94,5%) e 1 correspondente a *Archaea* (3%). *Firmicutes* foi o filo mais abundante, seguido por *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. A classe *Clostridia* compôs uma porção significativa das bactérias intestinais dos indivíduos, bem como *Bacteroidia* e *Negativicutes*. Já os gêneros mais abundantes foram *Faecalibacterium* e *Bacteroides*. As análises indicaram uma maior diversidade na microbiota do indivíduo que possuía uma alimentação mais rica em fibras e com menor consumo de gordura. A linhagem *L. plantarum* Lp-115 apresentou a capacidade de sobrevivência no trato gastrointestinal humano. Durante e pós-consumo do produto probiótico ocorreram mudanças no perfil geral dos filos e gêneros nos dois indivíduos quando comparados ao período anterior ao consumo. Enquanto foram observadas reduções em algumas bactérias potencialmente patogênicas, outras, reconhecidas por serem benéficas, apresentaram os níveis aumentados no ambiente intestinal. As porcentagens de *C. perfringens*, *Enterobacteriaceae*, *Shigella* e *S. aureus*, em relação a população bacteriana total, foram reduzidas nos dois indivíduos durante o consumo do microrganismo alvo. A importância dessa linhagem como microrganismo probiótico foi evidenciada ao induzir possíveis alterações positivas à saúde do hospedeiro. Ainda que escassas as investigações que utilizam a estratégia metagenômica para avaliar os efeitos de probióticos, essa abordagem tem expandido a compreensão sobre a microbiota fecal humana e os mecanismos pelos quais probióticos atuam sobre as comunidades complexas de microrganismos intestinais.

**Palavras-chave:** Microbiota fecal humana. Probióticos. Balanço microbiano. Metagenômica.

HENRIQUE, Fernanda Carla. **Impact of the consumption of *Lactobacillus plantarum* Lp-115 on human fecal microbiota.** 2014. 120p. Dissertation (Master's degree in Food Science) - State University of Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

The intestinal microbiota refers to the essentially bacterial ecosystem residing or passing through the human gastrointestinal tract. These complex communities of microorganisms are recognized as one of the most determinants status of health and/or disease. In this context, probiotic microorganisms are known for their ability to modulate the intestinal microbiota and are particularly associated with beneficial effects on their host's health. Evidences demonstrates that probiotics impacts directly or indirectly on the components of the intestinal microbiota. Among the lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* is being used in clinical studies as a promoter of beneficial effects to the host. However, its impact on the composition of the human fecal microbiota is little explored. In a previous study, a fermented milk supplemented with *Lactobacillus plantarum* Lp-115 was introduced in diet of healthy adult subjects. In this investigation, fecal samples on the time zero of the probiotic therapy were compared with samples referring to periods of consumption and post-consumption in order to evaluate changes in the microbial balance of two volunteers. This study characterized the composition of the fecal microbiota of these subjects. For this purpose, a variable region of the 16S ribosomal RNA gene was sequenced and amplified from the DNA of fecal material of the subjects via Ion Torrent platform and the data interpreted by Metagenomics-RAST web server. The process detected 15 members of the Eubacteria domain (94.5 %) and 1 corresponding member of the Archaea (3%). Firmicutes was the most abundant phylum, followed by Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria. The Clostridia class composed a significant portion of the individual intestinal bacteria, as well as Bacteroidia and Negativicutes, and the most abundant genera were *Faecalibacterium* and *Bacteroides*. The analyses indicated a greater diversity in the microbiota of the subject who had a high-fiber diet and consumed less fat. The strain *L. plantarum* Lp -115 demonstrated the ability to survive in the human gastrointestinal tract. During and after the consumption of the probiotic product, changes occurred in the pattern of phyla and genera of the two subjects when compared to the previous consumption period. While reductions were observed in some potentially pathogenic bacteria, some of the ones recognized to be beneficial had their levels increased in the intestinal environment. The percentages of *C. perfringens*, Enterobacteriaceae, *Shigella* and *S. aureus*, compared to the total bacterial population, were reduced in both subjects during the consumption of the target microorganism. The importance of this strain, as a probiotic microorganism, was evidenced by inducing positive changes on the microbial balance of the hosts. Although investigations using the metagenomic strategy to evaluate the effects of probiotics are scarce, this approach has expanded the understanding about the human fecal microbiota and the mechanisms by which probiotics act on complex communities of intestinal microorganisms.

**Keywords:** Human fecal microbiota. Probiotics. Microbial balance. Metagenomics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Estimativa dos principais gêneros da microbiota intestinal encontrados em diferentes órgãos do TGI humano ..... 21
- Figura 2** - Representação da diversidade microbiana (em divisões bacterianas/filos e arqueas) em sete ambientes diferentes ..... 23
- Figura 3** - Relação filogenética entre as sequências do gene 16S RNA ribossomal de bactérias presentes na microbiota intestinal de humanos. \**Mollicutes*, *Lactobacillaceae* e os agrupamentos de *Clostridium* IV e XIV são incluídos no filo *Firmicutes*. ..... 23
- Figura 4** - Padrões da diversidade microbiana ambiental e de vertebrados. \*A árvore da foto 1 demonstra um padrão que seria observado em um dendograma da microbiota ambiental, onde são expostas várias ramificações principais (filos) que se ramificam novamente em diferentes pontos (espécies), criando uma árvore com ramificação bastante complexa. Por outro lado, a diversidade da microbiota associada aos vertebrados (foto 2) exhibe um padrão mais restrito de ramificações principais (filos), exibindo, porém, grande número de ramificações secundárias (espécies). ..... 24
- Figura 5** - Gráfico demonstrando a contribuição dos 30 gêneros mais abundantes na microbiota fecal e seus respectivos filos. \*As cores das barras correspondem ao filo a que cada gênero pertence como indicado no gráfico em B. .... 25
- Figura 6** - Visualização e caracterização dos enterotipos de microbiota. \*Abundância dos principais contribuidores para cada enterotipo identificado nos 39 indivíduos. .... 26
- Figura 7** - Diferenças na microbiota fecal de crianças africanas (BF) e crianças europeias (EU). \*Valores médios dos gêneros bacterianos predominantes e seus filos correspondentes demonstrados em verde e vermelho. .... 30
- Figura 8** - Ion 314™ Chip. A forma elíptica cinzenta no centro contém 1.4 milhões de micropoços nanoscópicos que registram a reação de sequenciamento. .... 48

- Figura 9** - Sequenciamento no Ion Torrent: a) Preparação da biblioteca genômica: o DNA é fragmentado e adaptadores forward e reverse são ligados aos fragmentos. b) Cada fragmento é ligado a uma microesfera e clonado por amplificação pela PCR..... 49
- Figura 10** - Sequenciamento no Ion Chip: oligonucleotídeos iniciadores e a DNA polimerase são ligados às microesferas e estas são depositadas no chip (uma em cada micropoço); todos os quatro nucleotídeos preenchem o chip ciclicamente. No processamento de sinais, o software converte os dados em medidas de incorporação em cada micropoço para cada nucleotídeo sucessivo do fluxo. Após as bases determinadas, cada leitura é passada através de um filtro para exclusão das leituras com baixa precisão ..... 50

## CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Eletroforese do produto de PCR com aproximadamente 1500 pb em gel de agarose 0,8%, obtido a partir da amplificação do gene 16S rRNA de amostras fecais de quatro indivíduos nos três períodos de avaliação. MM: Marcador de tamanho Molecular (1Kb), + : controle positivo, - : controle negativo, nomenclaturas dos indivíduos ..... 70
- Figura 2** - Eletroforese do produto de PCR com aproximadamente 250 pb em gel de agarose 0,8%, obtido a partir da amplificação da região variável do gene 16S rRNA de amostras fecais de seis indivíduos nos três períodos de avaliação. MM: Marcador de tamanho Molecular (1Kb), + : controle positivo, - : controle negativo, nomenclaturas dos indivíduos ..... 72
- Figura 3** - Densidade de deposição das *Ion Spheres Particles* no chip de sequenciamento. A porcentagem de deposição em cada região do chip está representada por uma escala de cor onde as regiões em laranja e vermelho apresentam alta densidade ..... 72
- Figura 4** - Perfil geral do carregamento do chip e sequenciamento no Ion Torrent. \*Número total de sequências obtidas após filtragens para eliminar sequências de baixa qualidade e sequências policlonais. .... 73

## CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Distribuição de domínios taxonômicos presentes na microbiota fecal dos dois indivíduos amostrados ..... 79
- Figura 2** - Filos do domínio *Eubacteria* e *Archaea* encontrados na microbiota fecal dos dois indivíduos amostrados ..... 81
- Figura 3** - Principais classes (e respectivos filios) do domínio *Eubacteria* e *Archaea* encontradas na microbiota fecal dos dois indivíduos amostrados ..... 82
- Figura 4** - Abundância dos 20 gêneros mais frequentes encontrados na microbiota fecal dos dois indivíduos amostrados e seus respectivos filios bacterianos ..... 84

## CAPÍTULO 4

<b>Figura 1</b> - Gráfico com os valores da proporção amostral demonstrando a ocorrência de <i>L. plantarum</i> nas amostras fecais dos dois indivíduos nos três períodos de avaliação .....	95
<b>Figura 2</b> - Histograma dos gêneros mais abundantes nos dois indivíduos nos três períodos de avaliação .....	97
<b>Figura 3</b> - Histograma de abundância de grupos específicos nos dois indivíduos nos três períodos de avaliação .....	98
<b>Figura 4</b> - Dinâmica temporal do perfil de filos encontrados na microbiota fecal dos dois indivíduos. *Os números 1 e 2 correspondem aos indivíduos.....	99
<b>Figura 5</b> - Dinâmica temporal do perfil de gêneros encontrados na microbiota fecal do indivíduo 1 .....	100
<b>Figura 6</b> - Dinâmica temporal do perfil de gêneros encontrados na microbiota fecal do indivíduo 2.....	101
<b>Figura 7</b> - Dinâmica temporal das espécies de <i>Lactobacillus</i> detectadas na microbiota fecal dos dois indivíduos.....	102

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** - Algumas linhagens probióticas utilizadas em produtos comerciais nacionais e internacionais..... 35
- Tabela 2** - Fundamentos e critérios desejáveis para seleção de probióticos em aplicações comerciais..... 38

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** - Número de bases e leituras geradas no sequenciamento para cada amostra. A última coluna apresenta as sequências identificadas pelo MG-RAST como RNA ribossomal..... 73

### CAPÍTULO 4

- Tabela 1** - Comparação da frequência de espécies potencialmente patogênicas encontradas na microbiota fecal dos indivíduos nos três períodos de avaliação. Os valores estão representados pela porcentagem em relação a população bacteriana total. \*Diminuição durante a ingestão..... 103

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Riqueza de espécies distintas descrita pelo número de anotações de espécies diferentes no conjunto de dados do MG-RAST.....	104
---	-----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVOS</b> .....		19
<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
1.1	MICROBIOTA GASTROINTESTINAL .....	20
1.1.1	Colonização e Desenvolvimento da Microbiota Intestinal .....	26
1.1.2	Diversidade Inter-pessoal da Microbiota Fecal .....	28
1.2	PROBIÓTICOS .....	32
1.2.1	Gênero <i>Lactobacillus</i> .....	36
1.2.2	Crítérios de Seleção de Probióticos .....	37
1.2.3	Efeitos Benéficos de Microrganismos Probióticos sobre o Hospedeiro .....	37
1.3	ABORDAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE PROBIÓTICOS .....	41
1.3.1	O gene 16S RNA Ribossomal como Marcador Molecular .....	42
1.4	METAGENÔMICA .....	43
1.4.1	Sequenciadores de Nova Geração .....	45
1.4.1.1	Plataforma Ion Torrent PGM .....	47
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	50
2.1	GERAL .....	50
2.2	ESPECÍFICOS .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		51
<b>CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS INICIAIS</b> .....		64
<b>1</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	65
1.1	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E SUJEITOS DA PESQUISA PRELIMINAR .....	65
1.2	MATERIAL .....	65
1.3	MÉTODOS .....	66
1.3.1	Extração de DNA das Amostras Fecais .....	66
1.3.2	Amplificação do Gene 16S rRNA .....	66

1.3.3	Amplificação da Região Variável V4 do Gene 16S rRNA .....	67
1.3.4	Sequenciamento de DNA das Amostras Fecais.....	68
1.4	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS .....	68
<b>2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>70</b>
2.1	AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RNA RIBOSSOMAL.....	70
2.2	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO VARIÁVEL DO GENE 16S RNA RIBOSSOMAL .....	70
2.3	SEQUENCIAMENTO DE DNA DAS AMOSTRAS FECAIS .....	71
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>
	<b>CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL HUMANA POR ESTRATÉGIA METAGENÔMICA</b> .....	<b>76</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>78</b>
2.1	MATERIAL.....	78
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>79</b>
3.1	PERFIL DA MICROBIOTA FECAL DOS INDIVÍDUOS.....	79
3.2	DISCUSSÃO .....	85
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>88</b>
	<b>CAPÍTULO 4 - IMPACTO DA INGESTÃO DE <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp- 115 SOBRE A MICROBIOTA FECAL HUMANA</b> .....	<b>92</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>93</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>94</b>
2.1	MATERIAL.....	94
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>94</b>
3.1	PRESENÇA DO MICRORGANISMO ALVO NA MICROBIOTA FECAL .....	94

3.2	IMPACTO DA INGESTÃO DE <i>L. plantarum</i> SOBRE A MICROBIOTA FECAL .....	97
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	108
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	113
	<b>ANEXOS</b> .....	114
	ANEXO 1 .....	114
	ANEXO 2 .....	117

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

É estimado que os microrganismos que habitam nossos corpos atingem coletivamente mais de 100 trilhões de células, dez vezes o número de células do corpo humano (SAVAGE, 1977; LEY; PETERSON; GORDON, 2006; GERRITSEN et al., 2011). A maioria desses residem no trato gastrointestinal humano (TGI) e são fundamentais para influenciar a fisiologia e nutrição humana, além de favorecer a homeostase do intestino.

Nesse sentido, a microbiota intestinal tem sido reconhecida como o “último órgão descoberto” do corpo humano, demonstrando funções que variam desde auxílio na digestão e proteção contra patógenos até modulação do sistema imune e regulação do sistema nervoso central do hospedeiro, além de outras contribuições para o correto funcionamento do organismo (CLEMENTE et al., 2012). Na última década, houve um aumento expressivo no número de publicações que descreveram a microbiota intestinal. Essas investigações nos fornecem fortes evidências de uma clara associação entre a microbiota intestinal e a saúde humana (GERRITSEN et al., 2011).

Alterações na microbiota normal têm sido relacionadas a doenças imunológicas e metabólicas em humanos (incluindo obesidade, diabetes, arteriosclerose, câncer de cólon e uma variedade de condições inflamatórias) (MARTÍNEZ; MULLER; WALTER, 2013). Esta associação da microbiota intestinal com doenças humanas sugere o desenvolvimento de terapias que possuem o objetivo de restaurar o equilíbrio do TGI e, conseqüentemente, a saúde do hospedeiro.

Uma das alternativas de se modular a microbiota intestinal ocorre por intermédio da ingestão de microrganismos probióticos. De acordo com a definição formulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em reunião conjunta com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) probióticos são ‘microrganismos vivos, que quando administrados em doses adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro’ (FAO/WHO, 2001).

De fato, microrganismos probióticos são associados com efeitos benéficos a saúde do hospedeiro. Esses efeitos são comumente associados com a adesão desses microrganismos no TGI. Entretanto, discussões na literatura alegam que a colonização de microrganismos probióticos não é necessária para expressão dos efeitos benéficos visto que a persistência de

uma microbiota alóctone pode por si só promover tais efeitos (BERTAZZONI et al., 2013; COSTA et al., 2014).

Importante ressaltar que a maioria dos estudos que relatam os efeitos benéficos de culturas bacterianas probióticas são baseados em indivíduos debilitados com uma ou várias condições de doenças. A compreensão da manutenção desses microrganismos, e de sua influência na composição da microbiota fecal em populações saudáveis, ainda é muito limitada (COSTA et al., 2014).

Dentre outras espécies, *Lactobacillus plantarum* tem sido investigada quanto suas características como probiótico. Esse microrganismo é capaz de resistir às condições impostas pelo TGI (GOOSSENS et al., 2006) e seu consumo tem sido relacionado a melhorias significativas na saúde de humanos e animais (NARUSZEWICZ et al., 2002; YEN et al., 2006; PAOLILLO et al., 2009; WAUGH et al., 2009).

Em estudo preliminar conduzido por nosso grupo de pesquisa, um leite fermentado com *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* linhagem Lp-115, foi introduzido na dieta de indivíduos saudáveis e avaliou-se a quantidade da espécie alvo nas fezes durante variados períodos de consumo bem como o período pós consumo. Os dados deste trabalho demonstraram a ocorrência de *L. plantarum* na microbiota fecal durante o período de consumo do leite fermentado, no entanto, não ocorreu a detecção nos períodos pós consumo, reforçando os argumentos de que muitos probióticos não persistem de forma permanente no TGI quando a ingestão é interrompida.

No entanto, a ingestão de Lp-115 e sua presença como microbiota alóctone, pode ter sido suficiente para alterar o balanço microbiano no TGI. Desse modo, a hipótese do presente estudo foi a investigação das mudanças na composição da microbiota fecal ocasionadas pela terapia probiótica executada por Costa e colaboradores (2014).

Primeiramente, para compreensão e análise do impacto das bactérias na saúde humana e bem-estar, é necessário decifrar o conteúdo, diversidade e funcionamento dessas no intestino. Dessa forma, os componentes da microbiota intestinal, sobretudo a microbiota fecal, têm sido o tópico de estudos intensivos nos últimos anos e impulsionaram projetos de larga escala como o MetaHIT (*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) que caracterizou 3,3 milhões de genes microbianos (150 vezes o número de genes do genoma humano) (QIN et al., 2010). Visto que o primeiro passo para a compreensão do relacionamento simbiótico entre os microrganismos intestinais e seus hospedeiros é a caracterização da microbiota saudável e as

diferenças que são associadas a doença, o MetaHIT em conjunto com o Projeto Microbioma Humano (HMP) (THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012) fizeram progressos substanciais para que esse objetivo seja alcançado.

Inúmeros outros estudos tem demonstrado uma extensa variabilidade na composição da comunidade microbiana de indivíduos saudáveis (TURNBAUGH et al., 2009; CAPORASO et al., 2011; SCHLOISSNIG et al., 2013). As diferentes descrições referem-se a indivíduos de diversos países, todavia, o presente relato é a primeira descrição da microbiota fecal adulta de brasileiros.

Nesse contexto de compreensão de ecossistemas complexos, o sequenciamento do gene 16S rRNA representa o atual “estado-da-arte” para se determinar a composição da microbiota fecal. Uma vez que apenas uma pequena porcentagem dos microrganismos da nossa microbiota fecal pode ser cultivada, a abordagem metagenômica, combinada a ferramentas de biologia molecular e de bioinformática, é a mais indicada para essas investigações.

Adicionalmente, os sequenciadores de nova geração (*Next-generation Sequencing* - NGS) têm tido um impacto profundo na pesquisa e aumentado significativamente nosso entendimento sobre a diversidade da microbiota fecal. Entretanto, até poucos anos atrás, o sequenciamento de DNA por meio desses equipamentos era limitado por uma série de fatores que dificultavam o acesso em larga escala dentro de laboratórios pessoais.

Uma mudança de paradigma baseada na detecção “não óptica” das sequências de DNA surgiu com a plataforma Ion Torrent PGM (ROTHBERG et al., 2011). A simplicidade, escalabilidade e redução de custos e tempo para geração de uma sequência tem permitido o sequenciamento massivo de materiais genéticos extraídos de ecossistemas complexos, como o TGI humano.

O capítulo 1 apresenta os objetivos do trabalho e uma revisão da literatura sobre a microbiota intestinal e fecal, microrganismos probióticos e ferramentas de análises para detecção destes no TGI humano.

O capítulo 2 descreve os materiais e métodos utilizados nos capítulos subsequentes e os resultados iniciais das amplificações por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e do sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA) das amostras.

O capítulo 3 aborda uma descrição da microbiota fecal de dois indivíduos saudáveis e adultos residentes em Londrina, PR. O sequenciamento dos múltiplos genomas presentes nas

amostras fecais foi realizado por meio da plataforma Ion Torrent PGM e, em seguida, utilizado o servidor Metagenomics RAST para a interpretação dos dados.

No capítulo 4, as mesmas amostras fecais, foram comparadas com os períodos de consumo e pós-consumo de uma terapia probiótica de maneira a avaliar os impactos causados na microbiota fecal dos indivíduos pela ingestão do microrganismo alvo.

## REFERÊNCIAS

- BERTAZZONI, E.; DONELLI, G.; MIDTVEDT, T.; NICOLI, J.; SANZ, Y. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? **Journal of Chemotherapy**. v. 25, n. 4, p. 193-212, 2013.
- CAPORASO, J. G, LAUBER, C. L.; COSTELLO, E. K.; BERG-LYONS, D.; GONZALEZ, A.; STOMBAUGH, J.; KNIGHTS, D.; GAJER, P.; RAVEL, J.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Moving pictures of the human microbiome. **Genome Biology**. v. 12, n. 50, p. 1-8, 2011.
- CLEMENTE, J. C.; URSELL, L. K.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**. v. 148, p. 1258-1270, 2012.
- COSTA, G. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; VILAS-BÔAS, G. T.; MATSUO, T.; MIGLIORANZA, L. H. S. Potential fate of ingested *Lactobacillus plantarum* and its occurrence in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 80, n. 3, p. 1013-1019, 2014.
- FAO - Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. (2006). Report of a Joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 2001.
- GERRITSEN, J. SMIDT, H.; RIJKERS, G. T.; DE VOS, W. M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**. v. 6, p. 209-240, 2011.
- GOOSSENS, D. M.; JONKERS, D. E.; RUSSEL, M. M.; STOBBERINGH, E. E.; STOCKBRÜGGER, R. W. The effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 23, p. 255-263, 2006.
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**. v. 124, p. 837-848, 2006.
- MARTÍNEZ, I.; MULLER, C. E.; WALTER, J. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. **Plos One**. v. 8, i. 7, e69621, 2013.

NARUSZEWICZ, M.; JOHANSSON, M. L.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; BUKOWSKA, H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 76, p. 1249-1255, 2002.

PAOLILLO, R.; CARRATELLI, C. R.; SORRENTINO, S.; MAZZOLA, N.; RIZZO, A. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. **International Immunopharmacology**. v. 9, p. 1265-1271, 2009.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J. M.; HANSEN, T.; PASLIER, D. L.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORE, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J. METAHIT CONSORTIUM; BORK, P.; EHRlich, S. D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**. v. 464, n. 4, p. 59-67, 2010.

ROTHBERG, J. M.; HINZ, W.; REARICK, T. M.; SCHULTZ, J.; MILESki, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J. H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M. J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J. F.; MARRAN, D.; MYERS, J. W.; DAVIDSON, J. F.; BRANTING, A.; NOBILE, J. R.; PUC, B. P.; LIGHT, D.; CLARK, T. A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J. T.; STONER, I. B.; CAWLEY, S. E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOVA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARY, M.; DIMALANTA, E.; DRESSMAN, D.; KASINSKAS, R.; SOKOLSKY, T.; FIDANZA, J. A.; NAMSARAEV, E.; MCKERNAN, K. J.; WILLIAMS, A.; ROTH, G. T.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**. v. 475, p. 348-352, 2011.

SAVAGE, D. C. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. **Annual Review of Microbiology**. v. 31, p. 107-133, 1977.

SCHLOISSNIG, S.; ARUMUGAM, M.; SUNAGAWA, S.; MITREVA, M.; TAP, J.; ZHU A.; WALLER, A.; MENDE, D. R.; KULTIMA, J. R.; MARTIN, J.; KOTA, K.; SUNYAEV, S. R.; WEINSTOCK, G. M.; BORK, P. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. **Nature**. v. 493, p. 45-50, 2013.

THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**. v. 486, p. 207-214, 2012.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. B.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH, A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**. v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009.

WAUGH, A. G.; FOSHAUG, R.; MACFARLANE, S.; DOYLE, J. G.; CHURCHILL, T. A.; SYDORA, B. C.; FEDORAK, R. N. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v treatment in an animal model of irritable bowel syndrome. **Microbial Ecology in Health and Disease**. v. 21, p. 33-37, 2009.

YEN, D.; CHEUNG, J.; SCHEERENS, H.; POULET, F.; MCCLANAHAN, T.; MCKENZIE, B.; KLEINSHEK, M.A.; OWYANG, A.; MATTSON, J.; BLUMENSCHIN, W.; MURPHY, E.; SATHE, M.; CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A.; RENNICK, D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, p. 1310-1316, 2006.

# **CAPÍTULO 1**

---

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVOS**

---

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

Humanos e outros animais desenvolvem um relacionamento simbiótico obrigatório com trilhões de microrganismos e, portanto, possuem as superfícies de suas mucosas colonizadas por uma microbiota extremamente complexa. Particularmente o trato gastrointestinal humano (TGI), é o sistema que hospeda o maior número de microrganismos, pois apenas o cólon abriga 70% destes, e maior diversidade de bactérias (>1000 espécies) dentre aquelas que colonizam o corpo humano (FRANK et al., 2007; O'HARA; SHANAHAN, 2007; QIN et al., 2010; SEKIROV et al., 2010).

A comunidade microbiana comensal do TGI, chamada microbiota do TGI, é vital para inúmeras funções fisiológicas e homeostáticas e possui um papel importante no metabolismo e nutrição, defesa do hospedeiro por meio da maturação e modulação do sistema imune (80% do potencial imune se concentra na mucosa do intestino) e proteção contra patógenos (BEVINS; SALZMAN, 2011).

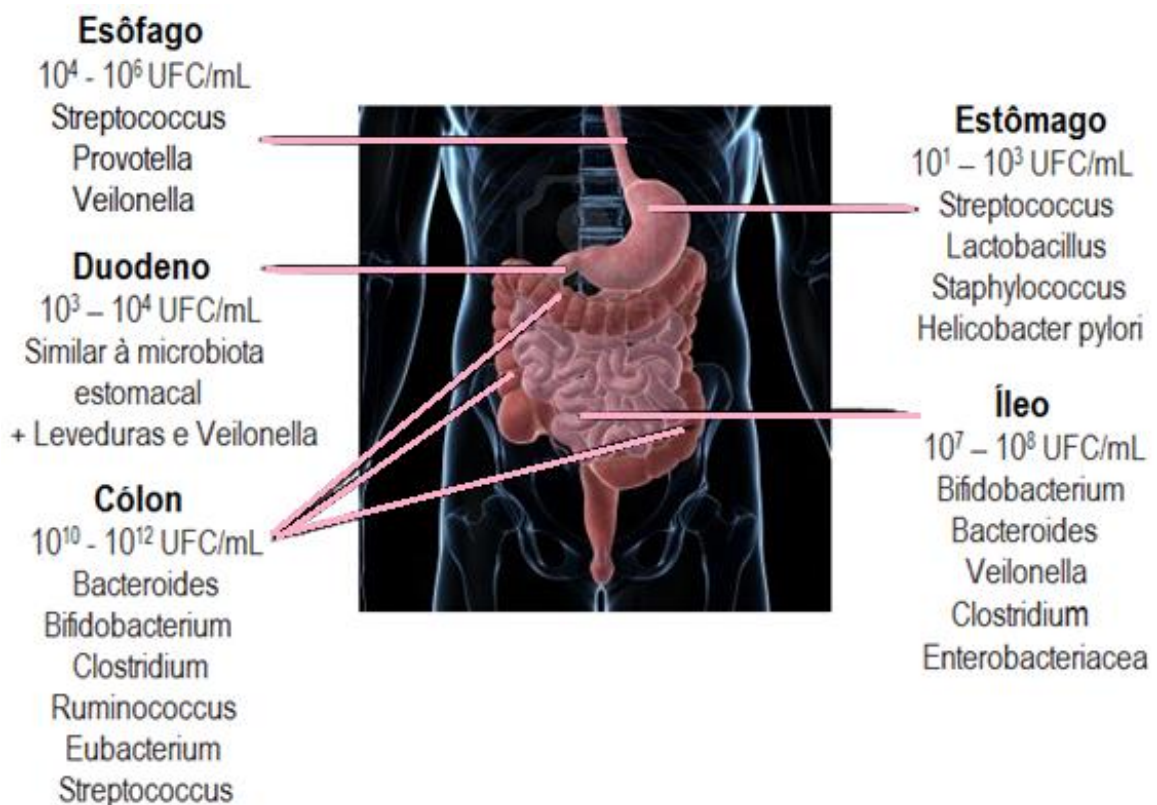
Esta microbiota, composta predominantemente por microrganismos anaeróbios estritos e facultativos, encontra-se distribuída ao longo do TGI de forma heterogênea (Fig. 1) e sua densidade e composição são altamente variáveis em cada órgão e entre indivíduos. A densidade de bactérias vivas demonstra um aumento progressivo ao longo do TGI de  $10^1$  a  $10^4$  células/g de conteúdo luminal no estômago e duodeno, avança para  $10^4$  a  $10^8$  células/g no jejuno e íleo e atinge concentrações de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  células/g no cólon (SIMRÉN et al., 2013).

As características específicas de cada órgão, como potencial de óxi-redução, pH, disponibilidade de nutrientes, entre outras, são os fatores responsáveis pela diferença de densidade e variedade das células microbianas. No TGI superior (esôfago e estômago) o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana devido à ação bactericida do suco gástrico. Já nas porções iniciais do intestino delgado (duodeno e jejuno), a presença da bile e da secreção pancreática, e o peristaltismo levemente elevado também resultam em uma microbiota reduzida (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Em contrapartida, o intestino delgado distal, denominado íleo, com diminuição do peristaltismo, mantém uma microbiota com maiores níveis populacionais. Finalmente, o intestino grosso, presente na porção inferior do TGI, é o principal sítio de colonização ( $10^{11}$  a

$10^{12}$  células/g de conteúdo luminal), com maior atividade metabólica e diversidade microbiana provavelmente por sua baixa motilidade intestinal e o baixo potencial de oxidação-redução (LEY; PETERSON; GORDON, 2006).

**Figura 1.** Estimativa dos principais gêneros microbianos da microbiota intestinal encontrados em diferentes órgãos do TGI humano.



Fonte: adaptado de Tiihonen; Ouwehand; Rautonen (2010).

Além da variação na concentração das células ao longo do TGI, determinadas espécies são encontradas tipicamente em diferentes regiões, reguladas pelo próprio meio, à medida que as condições apresentam-se favoráveis ou não (Fig. 1) (GUARNER; MALAGELADA, 2003). Dessa forma, a composição da microbiota é influenciada por vários fatores, dentre eles o ambiente do órgão, idade do hospedeiro, fatores genéticos e ambientais, dieta e exposição a quimioterápicos, antibióticos e probióticos (DUPONT; DUPONT, 2011).

Nesse sentido, há mais de um século, a descrição e compreensão da complexidade e ecologia da microbiota intestinal tornou-se um grande desafio para pesquisadores ao redor do mundo. A maioria dos estudos faziam uso de métodos convencionais de pesquisa microbiana,

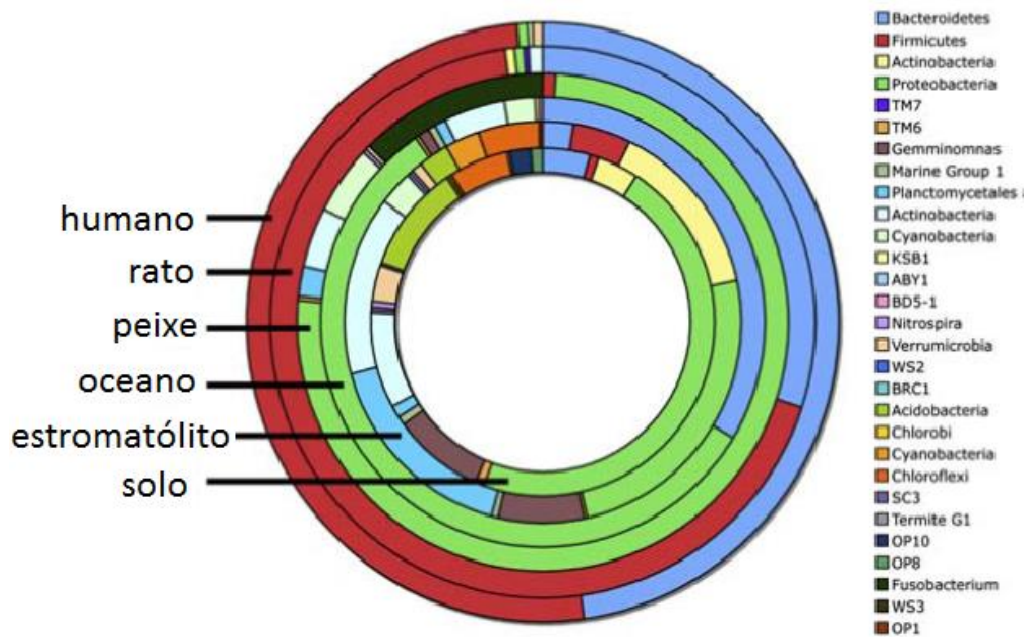
dependentes de cultivo em meios seletivos. Entre outros fatores limitantes desses métodos podem-se citar a baixa sensibilidade, baixa reprodutibilidade, longo tempo consumido para as análises e recuperação apenas de espécies cultiváveis (FURRIE, 2006). Estima-se que dentre as 1000 espécies que compõem o TGI, 80% a 99% não sejam cultiváveis fora do ambiente intestinal (RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004; ECKBURG et al., 2005; SEKIROV et al., 2010), o que compromete a confiabilidade das análises culturais.

A partir de 1998, o uso da biologia molecular no estudo da microbiota intestinal, em particular, o desenvolvimento de métodos que empregam análise de sequências de genes para genotipagem, têm demonstrado sucesso na caracterização da microbiota intestinal (FURRIE, 2006). Todavia, apenas em 2005, com o advento da metagenômica pôde-se observar uma revolução no conhecimento deste ecossistema complexo por meio da análise dos múltiplos genomas da microbiota do TGI (ECKBURG et al., 2005; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; SMIDT; DE VOS, 2007; FEENEY; SLEATOR, 2012).

De acordo com estudos baseados em metagenômica, os intestinos de humanos e ratos contêm poucas divisões bacterianas (Fig. 2) quando comparados com outros habitats, como o solo, que possui no mínimo 20 divisões. Essa maior diversidade do solo é devido sobretudo a decomposição de polissacarídeos de plantas à compostos simples de carbono (BÄCKHED et al., 2005).

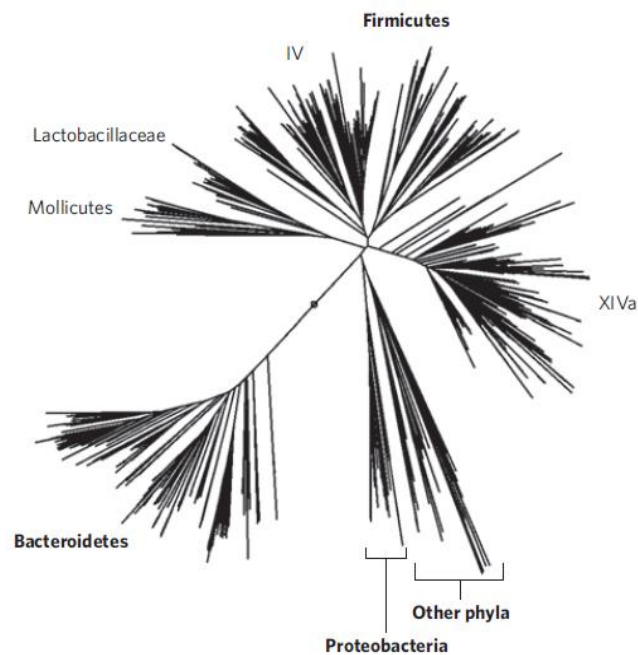
Entretanto, apesar da escassez de filos representados em humanos, há um excesso notável na diversidade de filotipos (similaridades na sequência de ácido desoxiribonucleico - DNA - que classificam um grupo de organismos) em termos de espécie e linhagem (Fig 3). Além disso, existem padrões similares em outros hospedeiros vertebrados (Fig. 4). Este padrão pode ser reflexo de uma longa história de estabilidade nos tipos de nichos associados aos animais terrestres, juntamente com fatores (tal como heterogeneidade do hospedeiro) que promovem a diversificação entre organismos que habitam nichos similares (DETHLEFSEN; MCFALL-NGAI; RELMAN, 2007).

**Figura 2.** Representação da diversidade microbiana (em divisões bacterianas/filos e arqueas) em sete ambientes diferentes.



Fonte: Ley; Peterson; Gordon (2006).

**Figura 3.** Relação filogenética entre as sequências do gene 16S RNA ribossomal de bactérias presentes na microbiota intestinal de humanos. \**Mollicutes*, *Lactobacillaceae* e os agrupamentos de *Clostridium* IV e XIV são incluídos no filo *Firmicutes*.



Fonte: Dethlefsen, McFall-Ngai; Relman (2007).

**Figura 4.** Padrões da diversidade microbiana ambiental e de vertebrados. \*A árvore da foto 1 demonstra um padrão que seria observado em um dendograma da microbiota ambiental, onde são expostas várias ramificações principais (filos) que se ramificam novamente em diferentes pontos (espécies), criando uma árvore com ramificação bastante complexa. Por outro lado, a diversidade da microbiota associada aos vertebrados (foto 2) exibe um padrão mais restrito de ramificações principais (filos), exibindo, porém, grande número de ramificações secundárias (espécies).



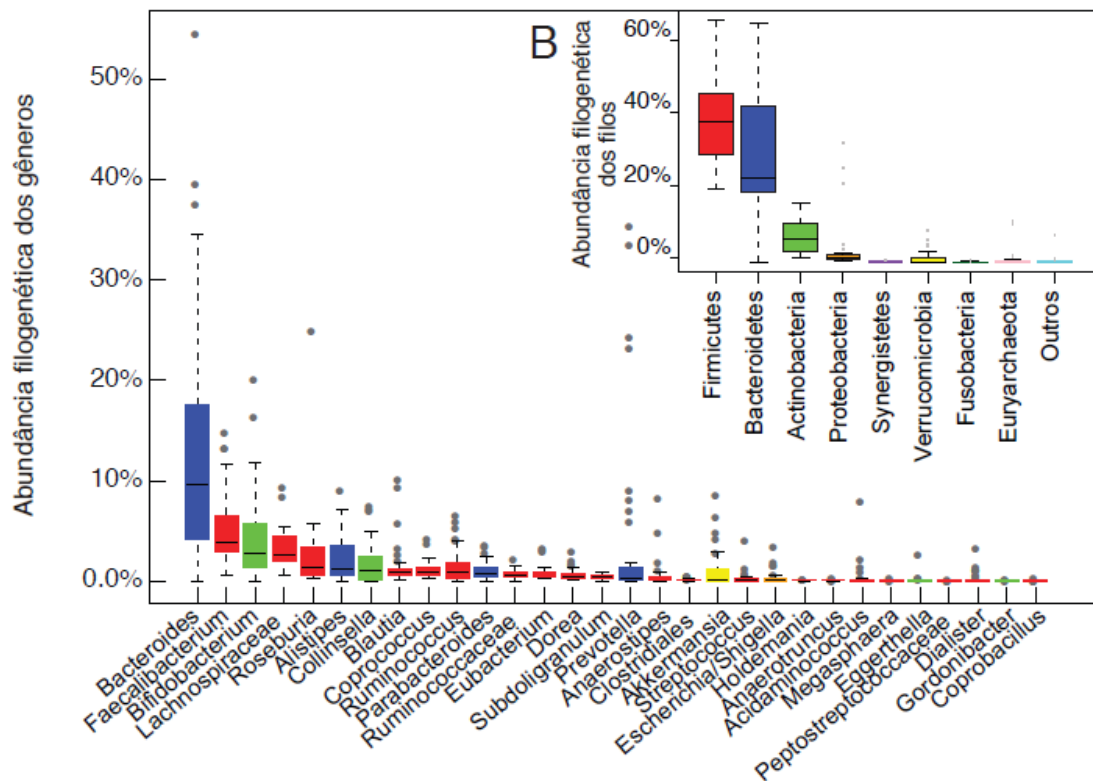
Fonte: Dethlefsen, McFall-Ngai; Relman (2007).

Apenas oito do total de 55 divisões bacterianas conhecidas são compreendidas ao longo do TGI humano. Entre estas, sete são mais comumente encontradas: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* (BÄCKHED et al., 2005; ECKBURG et al., 2005; LEY; PETERSON; GORDON, 2006), no entanto, apenas *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, demonstram-se dominantes totalizando mais de 85% de toda a população (FRANK et al., 2007; NEEF; SANZ, 2013).

Arumugam e colaboradores (2011), realizaram análises filogenéticas e funcionais a partir de metagenomas fecais de 39 indivíduos de 6 nacionalidades diferentes (basicamente europeus, americanos e japoneses) e demonstraram por meio da caracterização microbiana (Fig. 5) que realmente *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são as divisões bacterianas que constituem

ampla maioria da microbiota fecal humana, com o gênero *Bacteroides* sendo o mais abundante e ao mesmo tempo o mais variável ao longo das amostras.

**Figura 5.** Gráfico demonstrando a contribuição dos 30 gêneros mais abundantes na microbiota fecal e seus respectivos filos. \*As cores das barras correspondem ao filo a que cada gênero pertence como indicado no gráfico em B.

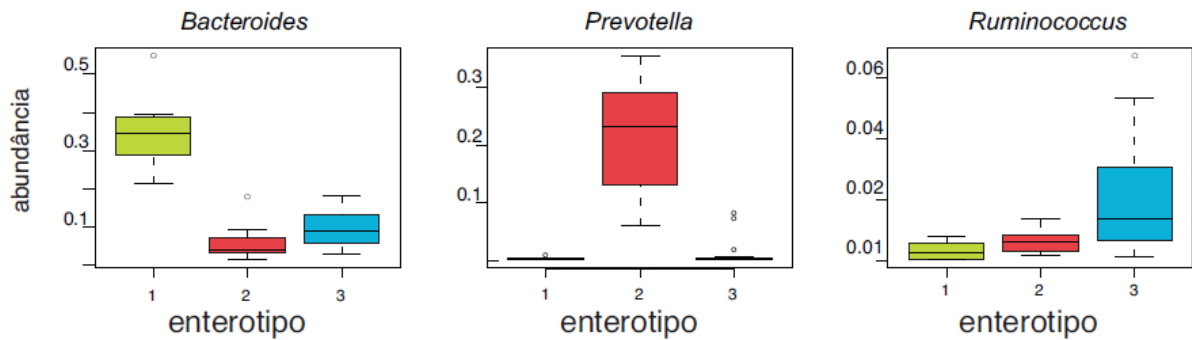


Fonte: Arumugam et al. (2011).

Adicionalmente, este estudo avaliou as similaridades dos perfis filogenéticos, representados pela frequência de gêneros em cada amostra. Uma análise multidimensional de grupos e de componentes principais mostraram que os indivíduos formam três grupos distintos que foram chamados de "enterotipos" (Fig. 6). Cada um desses três enterotipos são identificados pela variação nos níveis de um dos três gêneros: *Bacteroides* (enterotipo 1), *Prevotella* (enterotipo 2) e *Ruminococcus* (enterotipo 3). Uma análise de correlação dos 39 indivíduos mostra que a abundância de cada um dos três gêneros principais está fortemente correlacionada à representatividade de outros gêneros, seja co-ocorrendo ou inibindo os outros organismos. Isso sugere que os enterotipos são, na verdade, guiados por grupos de

espécies que juntas contribuem para uma composição da comunidade favorável para a sobrevivência de todos (ARUMUGAM et al., 2011).

**Figura 6.** Visualização e caracterização dos enterotipos de microbiota. \*Abundância dos principais contribuidores para cada enterotipo identificado nos 39 indivíduos.



Fonte: Arumugam et al. (2011).

### 1.1.1 Colonização e Desenvolvimento da Microbiota Intestinal

À medida que desenvolvemos desde a infância até a velhice, nossa microbiota também se altera. Logo após o nascimento, o TGI estéril de um recém-nascido é exposto a uma grande diversidade de microrganismos. Dessa forma, sua microbiota intestinal se desenvolve rapidamente, sendo influenciada por fatores genéticos, perfil de microbiota da mãe, via de parto (normal ou cesáreo) e o ambiente do nascimento (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). Posteriormente, durante os primeiros dias de vida os principais fatores que influenciam a microbiota ainda instável são a alimentação (amamentação *versus* fórmulas infantis) e o ambiente externo, no entanto, a grande mudança na composição ocorre com a introdução de alimentos sólidos e com o desmame.

Análises metagenômicas revelaram como o microbioma (conjunto de genes dos microrganismos) é enriquecido no início da vida humana com genes que facilitam a utilização de lactato quando a dieta do bebê é exclusivamente leite ou fórmulas infantis. Curiosamente, a capacidade de utilizar glicanos derivados de plantas é encontrada antes da introdução de alimentos sólidos, sugerindo que o intestino infantil está pronto para mudar para uma dieta “sólida” antes da mudança real acontecer (KOENIG et al., 2011). Dessa forma, a composição da microbiota começa a convergir para uma microbiota adulta no final do primeiro ano de

vida (PALMER et al., 2007), assemelhando-se totalmente a um adulto com aproximadamente 2,5 anos (KOENIG et al., 2011). Essa colonização inicial influencia irreversivelmente a microbiota posterior e a saúde da criança (FAVIER et al., 2002; ISOLAURI; SALMINEN, 2005).

Com o passar do tempo, as bactérias comensais que formaram a microbiota do recém-nascido e outras que as sucedem em conjunto com diferentes microrganismos (arqueas, vírus e leveduras), multiplicam-se exponencialmente e superam quantitativamente as células somáticas e germinativas do nosso corpo, por um fator de pelo menos 10 (BÄCKHED et al., 2005).

O mutualismo entre hospedeiro e microrganismo no TGI humano fornece um ambiente hospitaleiro, rico em nutrientes e com temperatura estável para as bactérias e, em troca, o hospedeiro recebe inúmeras contribuições, as quais incluem: absorção e estocagem de nutrientes; aproveitamento de energia a partir de elementos da dieta que poderiam ser perdidos na excreção (GUARNER; MALAGELADA, 2003); resistência à colonização por microrganismos exógenos, ou seja, efeito barreira e prevenção contra patógenos e doenças (RAKOFF-NAHOUM et al., 2004); homeostase e estímulo do desenvolvimento do sistema imune (ROUND; MAZMANIAN, 2009).

Ao longo da vida adulta, a microbiota é composta por espécies autóctones, membros permanentes que colonizam e crescem no local em que são encontrados, e por espécies alóctones, membros transitórios que são adquiridos de uma origem externa (alimentos, água e componentes ambientais) e estão de passagem pelo local (LEY; PETERSON; GORDON, 2006). Desse modo, a microbiota é dinâmica, decorrente da interação de fatores genéticos, o ambiente ou doenças a que o indivíduo está exposto, sua dieta, secreção de muco e enzimas digestivas e o peristaltismo intestinal, entre outros fatores.

Perturbações nesta microbiota normal (disbiose) têm sido relacionadas com condições de saúde adversas, tais como obesidade, diabetes, arteriosclerose e doenças inflamatórias intestinais (DUPONT; DUPONT, 2011). Mudanças na composição têm sido identificadas com o avanço da idade, sendo a microbiota de bebês e crianças geralmente enriquecidas pelo gênero *Bifidobacterium* (FAVIER et al., 2002; PALMER et al., 2007).

A razão *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) demonstra ser de significativa relevância em sinalizar o estado da microbiota intestinal, sendo frequentemente associada a saúde ou doença. Esta razão sofre um aumento desde o nascimento até a idade adulta e é ainda mais

alterada com o avanço da idade, onde a proporção de *Firmicutes* é significativamente menor (CLAESSON et al., 2011). Adicionalmente, foi observado em idosos, aumento nas contagens de *Escherichia coli*, clostrídios e lactobacilos e uma diminuição de bifidobactérias (MARIAT et al., 2009; O’SULLIVAN et al., 2013). Essas alterações que ocorrem naturalmente nos idosos, devido às mudanças de hábitos, restrições alimentares e diminuição da função imune são mais impactadas com o uso de medicações, principalmente tratamentos com antibióticos (TIIHONEN; OUWEHAND; RAUTONEN, 2010).

### 1.1.2 Diversidade Inter-pessoal da Microbiota Fecal

Evidências de estudos estabeleceram que cada indivíduo possui uma microbiota característica única. Apesar de seguirmos o padrão geral de dois filos predominantes, estudos tem descrito uma diversidade considerável mesmo entre indivíduos saudáveis (THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). Embora esta diferença seja especialmente apontada nos 2,5 primeiros anos de vida quando a microbiota ainda é instável, adultos saudáveis possuem uma microbiota relativamente estável e uma combinação própria de bactérias (espécies autóctones e alóctones).

Ley e colaboradores (2006), bem como Costello e colaboradores (2009) afirmam que as fezes são um representativo das diferenças inter-individuais. Em suas investigações a respeito da dinâmica temporal da microbiota, a estrutura populacional da comunidade intestinal (fecal) foi altamente variável entre as pessoas, no entanto, exibiu uma variabilidade mínima intra-pessoal ao longo do período de suas avaliações (1 ano e 2 meses, respectivamente). Os autores concluíram que os grupos filogenéticos predominantes na microbiota fecal da população estudada se mantiveram estáveis durante o período estudado e que não houve diferenças importantes entre homens e mulheres. Ficou evidenciado claramente que nessas análises da consistência temporal da microbiota, as variáveis dieta, doença e ambiente foram mantidas constantes.

Em discordância, Caporaso e colaboradores (2011b), realizaram a maior análise temporal da microbiota humana (2 sujeitos, amostras diárias por 15 meses) e apesar das diferenças inter-pessoais anteriormente relatadas, observaram também uma variabilidade na microbiota do mesmo indivíduo com o passar de meses, semanas e até mesmo dias. Estes resultados contrariaram investigações anteriores e sugeriram que a microbiota fecal humana

adulta pode ser consideravelmente menos estável como historicamente reconhecido e estipulado por Savage (1977).

Para elucidação dessa hipótese, dois estudos recentes de larga-escala determinaram que a maior parte da microbiota fecal humana é composta por aproximadamente 68 espécies (consideradas membros autóctones), suportando a ideia de um grupo dominante entre indivíduos saudáveis. A análise temporal descreveu que essas espécies dominantes constituem, quantitativamente, 75% de toda a comunidade microbiana (MARTÍNEZ; MULLER; WALTER, 2013; SCHLOISSNIG et al., 2013). Dessa forma, apesar de ocorrerem pequenas flutuações temporais, o microbioma fecal humano é dominado por espécies que formam populações estáveis durante longos períodos de tempo. Esses filotipos que são compartilhados afirmam a hipótese de que humanos partilham um núcleo (*core*) comum de microrganismos.

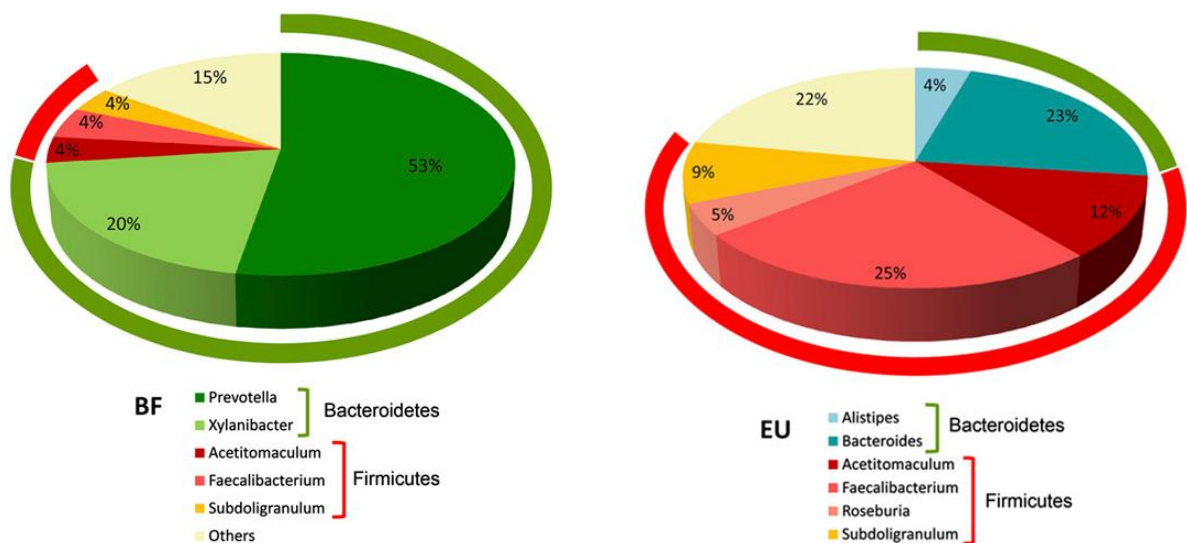
A diversidade microbiana inter-pessoal abordada até o momento pode ser dependente de vários fatores. Por esse motivo, inúmeros estudos foram realizados recentemente para compreensão do que realmente estabelece o perfil da microbiota intestinal humana, o conjunto de genes microbianos (microbioma) e suas funções a serem expressadas. Segundo os pesquisadores os fatores determinantes podem incluir dieta (WU et al., 2011; DAVID et al., 2014), genética do hospedeiro e relacionamentos familiares (TURNBAUGH et al., 2009a; YATSUNENKO et al., 2012), diferentes culturas e geografia (DE FILIPPO et al., 2010; YATSUNENKO et al., 2012), idade (MARIAT et al., 2009; CLAESSION et al., 2011; O'SULLIVAN et al., 2011); gravidez (KOREN et al., 2012); via de parto (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010), obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo II (TURNBAUGH et al., 2009a; QIN et al., 2010; ISMAIL et al., 2011; VRIEZE et al., 2012), doença cardiovascular (WANG et al., 2011), distúrbios produzidos por antibióticos (O'SULLIVAN et al., 2013) incluindo colites pseudomembranosas causadas por *Clostridium difficile* (GOUGH; SHAIKH; MANGES, 2011) e outras formas de doenças inflamatórias intestinais (FRANK et al., 2007; WILLING et al., 2010; SIMRÉN et al., 2013).

Especificamente a dieta tem demonstrado efeitos significativos sobre a microbiota. Por exemplo, foi demonstrado em camundongos que a mudança de uma dieta com pouca gordura e rica em polissacarídeos de plantas para uma dieta típica “ocidental” (rica em açúcar e gordura) pode mudar a microbiota dentro de um dia com alterações nas vias metabólicas e expressão de genes (TURNBAUGH et al., 2009b). Outro estudo em humanos constatou, da

mesma forma, mudanças na microbiota fecal dentro de 24 horas quando uma dieta pobre em gordura/rica em fibra era alterada por outra rica em açúcar/pobre em fibra e vice-versa (WU et al., 2011). Curiosamente, a dieta também é relacionada aos enterotipos da microbiota intestinal (Fig. 6), onde indivíduos com uma dieta rica em gordura animal tem a microbiota dominada por *Bacteroides* (enterotipo 1), enquanto uma dieta rica em carboidratos é associada com o enterotipo 2 - microbiota dominada por *Prevotella* (WU et al., 2011).

A industrialização igualmente tem mudado nossos hábitos alimentares e, consequente, microbiota como evidenciado por meio de uma clara separação na composição da microbiota fecal de crianças africanas com crianças italianas (Fig. 7). As 14 crianças de Boulpon (vilarejo de Burkina Faso) possuem uma dieta predominantemente vegetariana, sendo pobre em gordura e proteína animal e rica em amido, fibra e polissacarídeos de plantas. Por outro lado, as 15 crianças da área urbana de Florença (capital de Toscana) consomem a dieta ocidental típica, rica em proteína animal, açúcar, amido, gordura e pobre em fibra. A microbiota das crianças africanas apresentou um enriquecimento expressivo de *Bacteroidetes*, especialmente dos gêneros *Prevotella* e *Xylanibacter*, além de conter certos genes bacterianos para hidrólise da parede celular das plantas (xilanases e celulases), totalmente ausente nas crianças europeias (DE FILIPPO et al., 2010).

**Figura 7.** Diferenças na microbiota fecal de crianças africanas (BF) e crianças europeias (EU). \*Valores médios dos gêneros bacterianos predominantes e seus filos correspondentes demonstrados em verde e vermelho.



Fonte: De Filippo et al. (2011).

Ainda que existam evidências indicando que indivíduos obesos tem um aumento de *Firmicutes* e uma diminuição de *Bacteroidetes* (LEY et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2009a; ISMAIL et al., 2011), outros estudos falharam em reportar essas observações (DUNCAN et al., 2008; SCHWIERTZ et al., 2009). Apesar das diferenças na composição da microbiota fecal de obesos e magros ainda serem questionáveis, predições do metabolismo da comunidade microbiana, baseadas em conteúdo dos genes, indicam que a microbiota associada a obesos possui uma capacidade maior em coletar energia dos alimentos, por meio da quebra mais eficiente de polissacarídeos (THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). Segundo Turnbaugh e colaboradores (2006), uma quantidade menor de energia permaneceu nas fezes de camundongos obesos em relação a seus homólogos magros, comprovando essa capacidade aumentada que o microbioma obeso possui em extrair energia da dieta.

Curiosamente, o fenótipo de coleta de energia também pode ser transmissível simplesmente pelo transplante da “microbiota obesa”. A colonização de camundongos isentos de bactérias (*germ-free*) com uma ‘microbiota obesa’ resultou em um aumento significativo na gordura corporal quando comparado com os animais colonizados por uma ‘microbiota magra’ (TURNBAUGH et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2008). Outro estudo relatou ainda que a relação F/B decresce com a perda de peso em uma dieta de baixa caloria (LEY et al., 2006).

Diante desse contexto, os mecanismos pelos quais os diversos fatores, principalmente dieta, ambiente e genética, moldam a microbiota fecal humana não está totalmente esclarecido, pois múltiplos fatores podem ser frequentemente confundidos. Por exemplo, gêmeos possuem uma microbiota fecal mais similar do que indivíduos não-relacionados, sugerindo uma influência genética sobre a microbiota. Entretanto, até mesmo em gêmeos monozigóticos, a microbiota fecal é altamente individualizada ao nível de espécies de bactérias (DICKSVED et al., 2008; TURNBAUGH et al., 2009a).

Por razões práticas, nosso conhecimento sobre a composição da microbiota do TGI resulta principalmente da análise de amostras fecais. Neste sentido, torna-se questionável a representação de toda microbiota intestinal por meio dos microrganismos fecais, uma vez que são oriundos do lúmen e do cólon sigmóide. É evidente que para informações mais precisas sobre a população microbiana do TGI, as amostras adequadas deveriam ser tomadas durante

endoscopias, colonoscopias ou processos cirúrgicos, o que torna o acesso bastante invasivo e, portanto, desaconselhado e pouco utilizado em pesquisas (COSTA et al., 2014).

Segundo Tannock (2005), a microbiota fecal pode realmente refletir a microbiota intestinal. Quando amostras são colhidas por biópsia do cólon intestinal, estas não estão livres de contaminação, pois o fluido fecal está constantemente presente na mucosa. Assim, ainda não é totalmente claro na literatura se o que está sendo descrito é a composição da microbiota da mucosa isoladamente, ou se abriga parte da comunidade fecal.

Estudos indicaram que a comunidade microbiana dominante nas amostras fecais, em pelo menos metade dos indivíduos amostrados, não representa necessariamente o encontrado em outros compartimentos do TGI, incluindo a mucosa do cólon (ZOETENDAL et al., 2002; LEPAGE et al., 2005). Em discordância, Delgado, Suárez e Mayo (2006) descreveram grandes semelhanças entre a composição bacteriana de amostras fecais e da mucosa, pelo menos no que se referia às espécies predominantes.

De qualquer modo, a maioria dos estudos em humanos são baseados na avaliação do perfil da microbiota fecal. Diversas investigações são realizadas com o objetivo de avaliar alterações da microbiota em idosos (BARTOSCH et al., 2005; MARIAT et al., 2009; CLAEISSON et al., 2011), obesos (ISMAIL et al., 2011), crianças amamentadas *versus* alimentadas por substitutos do leite materno (PENDERS et al., 2006), indivíduos com doenças inflamatórias intestinais (MANICHANH et al., 2006; WILLING et al., 2010) e após terapia com antibióticos (BARTOSCH et al., 2004; O’SULLIVAN et al., 2013) ou probióticos (fortemente associados a efeitos benéficos à saúde e à manutenção e/ou restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal) (TANNOCK et al., 2000; GOOSSENS et al., 2006; McNULTY et al., 2011; WANG et al., 2014).

## 1.2 PROBIÓTICOS

A utilização de produtos lácteos fermentados com fins de promoção da saúde iniciou-se muito tempo antes da descoberta dos microrganismos. O primeiro relato escrito data aproximadamente 76 a.C. quando o historiador romano Plínio recomendava a administração de produtos lácteos fermentados no tratamento de gastroenterites (BOTTAZI, 1983; JANKOVIC et al., 2010). No entanto, os estudos envolvendo estes microrganismos e seus efeitos clínicos são contemporâneos, e se baseiam na produção de substâncias benéficas e/ou

promoção de um equilíbrio microbiano que favoreça o hospedeiro (COSTA; MIGLIORANZA, 2012).

Estudos de inúmeros cientistas, principalmente microbiologistas, tornaram possível o desenvolvimento e a expansão do conhecimento a respeito da microbiota do corpo humano. Em 1885, Escherich foi o primeiro a reconhecer a importância de se examinar a ocorrência de bactérias nas fezes humanas para que, conseqüentemente, se pudesse compreender a fisiologia da digestão e a patologia e tratamento de doenças intestinais de origem microbiana (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Já o conceito de microrganismos benéficos foi pioneiramente aplicado em 1905 por Ilya Metchnikoff - cientista russo, prêmio Nobel e professor do *Institute Pasteur* - quando este sugeriu o impacto positivo do consumo de lácteos fermentados sobre a microbiota intestinal, atribuindo-lhes a propriedade de manutenção da saúde e longevidade do hospedeiro, por meio da colonização de lactobacilos e diminuição de patógenos (SOCCOL et al., 2010).

Décadas depois, o termo “probiótico” - pró-vida - foi inicialmente utilizado como antônimo da palavra “antibiótico”, sendo definido de diferentes formas por vários pesquisadores. Fuller (1989) popularizou o termo, com a definição mais frequentemente citada, quando definiu probiótico como suplemento alimentar à base de microrganismos vivos, com efeitos benéficos ao hospedeiro por equilibrar sua microbiota intestinal. Salminen e colaboradores (1999), estenderam a ação dos probióticos também às células inativas e propuseram sua inclusão na definição geral.

A FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a WHO (*World Health Organization*) mantêm o conceito geral definindo probióticos como microrganismos vivos, que quando administrados em doses adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; ANVISA, 2005). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), segue a designação, e preconiza a ingestão de  $10^8 - 10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC), na recomendação diária do produto pronto para consumo, como quantidade mínima de bactérias viáveis para designação de um alimento probiótico.

Bertazzoni e colaboradores (2013) salientam que a concentração da formulação a ser ingerida deve ser ajustada, visto que os probióticos possuem uma baixa capacidade de multiplicação no TGI humano e necessitam ser viáveis para que seus efeitos benéficos sejam expressos (no entanto, o conceito do ‘microrganismo vivo’ está sendo alterado gradativamente). Os ajustes na concentração devem compreender a diluição fisiológica que

ocorre no TGI; a capacidade da linhagem probiótica sobreviver ao ambiente do TGI; a forma de administração do probiótico; a linhagem probiótica (cada uma possui capacidades de sobrevivências únicas) e, finalmente, o efeito benéfico esperado.

Adicionalmente, o número de bactérias viáveis que alcançam o intestino não depende apenas da dose ingerida, mas também de outros fatores. A composição da microbiota intestinal que varia de uma pessoa para outra, motilidade intestinal e o pH gástrico individuais, bem como a formulação probiótica, e a co-administração de alimentos ou leites (que podem proteger o probiótico do ácido gástrico) interferem no número de bactérias finais que alcançarão o intestino (BERTAZZONI et al., 2013).

Na lista de alegações de propriedade funcional publicada pela Anvisa, o órgão caracteriza como probiótico e aprova o uso comercial das seguintes bactérias: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2005). Os microrganismos *L. delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) foram retirados da lista, pois apesar de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado. Nos demais países, a FAO e WHO caracterizam como probióticos um número mais amplo de microrganismos (Tabela 1).

Atualmente, nosso conhecimento sobre probióticos e sua interação com o hospedeiro tem aumentado exponencialmente e muitos mecanismos de ação tem sido relatados. Definitivamente, a literatura científica reporta evidências clínicas suficientes para comprovar que as alegações de saúde atribuídas à probióticos são provenientes a um aumento destes em um dado ambiente e a uma diminuição de bactérias potencialmente patogênicas (JANKOVIC et al., 2010). Além disso, há anos é estabelecido que a ingestão de probióticos altera a microbiota fecal de indivíduos saudáveis, em favor de espécies de lactobacilos e bifidobactérias (COSTA; MIGLIORANZA, 2012).

As bactérias do ácido lático (BAL), principalmente o gênero *Lactobacillus*, e as bactérias do gênero *Bifidobacterium* são as mais importantes comercialmente (SOCCOL et al., 2010). Embora outros gêneros bacterianos como *Escherichia*, *Bacillus* e *Enterococcus* estejam sendo estudados como “candidatos” a serem utilizados em produtos, ainda há preocupações em relação a segurança de tais probióticos, visto que esses gêneros contêm espécies potencialmente patogênicas (MARTINS et al., 2009).

Adicionalmente, as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas em preparações farmacêuticas como probiótico. Segundo Martins e colaboradores (2005), a levedura possui as vantagens de ser rapidamente eliminada após interrupção da terapia probiótica e não ser afetada pelo uso de antibacterianos, além da possibilidade de liofilização.

**Tabela 1.** Algumas linhagens probióticas utilizadas em produtos comerciais nacionais e internacionais.

<b>Microrganismo</b>	<b>Linhagem</b>
<i>Bacillus clausii</i>	Enterogermina
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703 / 94-BIM
<i>Bifidobacterium animalis</i>	BB-12™
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	BB-12™
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Bb-11™
<i>Bifidobacterium breve</i>	Yakult / BB-03
<i>Bifidobacterium essencis</i>	Danone™
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Shirota™ / Immunitas™ / 744
<i>Bifidobacterium longum</i>	SBT2928 / BB536 / UCC 35624
<i>Clostridium butyricum</i>	Miyarisan
<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Escherichia coli</i> nissle	Mutaflor
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA1™ / LA5™ / NCFM / DDS-1 / SBT-2062 / La-14™
<i>Lactobacillus casei</i>	Shitora™ / Immunitas™ / LC™
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Lb12
<i>Lactobacillus fermentum</i>	RC-14
<i>Lactobacillus helveticus</i>	B02
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	La21™
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CRL431™ / F19
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LB21 / GR-1 / GG1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	229 Probi™ / Lp115™ / Lp01
<i>Lactobacillus reuteri</i>	SD2112 / MM2
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Ls-33
<i>Lactococcus lactis</i>	L1A
<i>Saccharomyces boulardii</i>	17™
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCYC Sc 47

Fonte: Adaptado de Shah (2007) e Soccol (2010).

### 1.2.1 Gênero *Lactobacillus*

Os lactobacilos pertencem ao grupo das BAL e compreendem um importante grupo de bactérias comuns do trato urogenital (TGU) e gastrointestinal (TGI) de seres humanos e animais (CLAESSON; SINDEREN; O'TOOLE, 2007). Diversas espécies de *Lactobacillus* são associadas com a produção de alimentos devido à sua ação conservante (acidificação do meio), melhoria no sabor e textura e à competição e inibição da microbiota deteriorante e/ou agentes patogênicos (LEE et al., 2009).

Dentre os 13 gêneros que compõem o grupo das BAL, o gênero *Lactobacillus* é o maior com mais de 150 espécies descritas (<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html>). Além disso, *Lactobacillales* é a maior ordem do filo *Firmicutes* e da classe *Bacilli* (BERGER et al., 2007). Adicionalmente, as bactérias do gênero *Lactobacillus* podem ser definidas morfolologicamente como Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, anaeróbicas ou aerotolerantes, acidodúricas, homofermentativas ou heterofermentativas, possuindo uma complexa necessidade nutricional (carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, ácidos nucleicos e vitaminas) (LEE et al., 2009).

Particularmente, a espécie *Lactobacillus plantarum* foi a primeira do gênero a ter seu genoma sequenciado (KLEEREBEZEM et al., 2003) e embora não seja considerada probiótico pela legislação brasileira, é caracterizada como tal em muitos outros países, onde é utilizada em alguns produtos e apresenta um longo histórico de uso seguro (DE VRIES et al., 2006).

*L. plantarum* apresenta um considerável número de genes relacionados ao transporte e utilização de carboidratos, além de genes para produção de exopolissacarídeos e agentes antimicrobianos. Esse conteúdo de genes e seu genoma relativamente grande, indicam uma boa adaptação a diversos ambientes e condições diferentes, incluindo o TGI humano (KLEEREBEZEM et al., 2003).

Estudos recentes têm atribuído a *L. plantarum* habilidades para modular o sistema imune (PAOLILLO et al., 2009), reduzir o risco de doenças cardiovasculares (NARUSZEWICZ et al., 2002), atenuar desordens intestinais (YEN et al., 2006), produção de folato (HUGENSCHMIDT et al., 2010), atividade antimicrobiana contra patógenos (*Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*) (BUJALANCE et al., 2007), entre outros benefícios à saúde como a produção de ácidos graxos de cadeia curta

(AGCC) que inibem produtos carcinogênicos por meio da redução da atividade enzimática (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al., 2011). Nosso grupo de pesquisa constatou que a ingestão de um leite fermentado por *L. plantarum* reduziu dois importantes fatores de riscos cardiovasculares, como o teor de glicose no sangue e homocisteína, em mulheres na pós-menopausa e com síndrome metabólica (BARRETO et al., 2014).

### 1.2.2 Critérios de Seleção de Probióticos

A importância de algumas características tecnológicas e fisiológicas essenciais para linhagens probióticas foi reconhecida há muito tempo. Em 1957, Gordon, Macrae e Wheeler observaram que o sucesso de uma terapia com lactobacilos só era possível se a linhagem fosse comum do TGI, não-patogênica e sobrevivesse no intestino ao ser ingerida em concentrações substancialmente elevadas ( $10^7 - 10^9$  UFC/mL de produto) (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Embora inúmeros critérios de seleção de probióticos tenham sido reconhecidos e sugeridos ao decorrer do tempo, há um acordo geral com relação às características principais (Tabela 2). Destacam-se a definição da origem e identificação, ser inócuo, apresentar resistência a ambientes inóspitos e, possuir atributos tecnológicos que propiciem sua viabilidade em quantidade suficiente para promover incrementos na saúde do hospedeiro (GUEIMONDE; SALMINEN, 2006).

Linhagens probióticas devem possuir *Status GRAS* (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, um histórico de uso seguro na indústria alimentícia. Caso não haja histórico, são necessários estudos pré-clínicos (JANKOVIC et al., 2010). Também devem se manter viáveis durante e após o processamento, o transporte e estocagem no produto que as contém, além de manterem uma estabilidade que garanta o efeito benéfico quando consumidas (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al., 2011).

### 1.2.3 Efeitos Benéficos de Microrganismos Probióticos sobre o Hospedeiro

A correção da microbiota autóctone desbalanceada constitui a racionalidade da terapia por probióticos (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). Dessa forma, estes microrganismos podem fornecer benefícios à saúde humana e animal, principalmente por intermédio da manutenção do equilíbrio e composição da microbiota intestinal.

**Tabela 2.** Fundamentos e critérios desejáveis para seleção de probióticos em aplicações comerciais.

<b>Geral</b>	<b>Propriedade</b>
Critérios de segurança	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Origem</li> <li>- Patogenicidade e infecciosidade</li> <li>- Fatores de virulência → toxicidade, atividade metabólica e propriedades intrínsecas, ou seja, resistência contra antibióticos</li> </ul>
Critérios tecnológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Linhagens geneticamente estáveis</li> <li>- Viabilidade desejada durante o processamento e armazenamento</li> <li>- Boas propriedades sensoriais</li> <li>- Resistência aos fagos</li> <li>- Produção em grande escala</li> </ul>
Critérios funcionais	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tolerância ao pH ácido e ao suco gástrico</li> <li>- Tolerância à bile</li> <li>- Adesão à superfície da mucosa</li> <li>- Efeitos à saúde validados e documentados</li> <li>- Co-agregação/adesão</li> </ul>
Critérios fisiológicos desejáveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Imunomodulação</li> <li>- Atividade antagônica em relação à patógenos gastrointestinais como, <i>Helicobacter pylori</i> e <i>Candida albicans</i>.</li> <li>- Ação no metabolismo do colesterol</li> <li>- Melhora no metabolismo de lactose</li> <li>- Propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Vasiljevic; Shah (2008).

Segundo Nicoli e Vieira (2004), os benefícios esperados são geralmente os mesmos oferecidos em condições normais pela microbiota autóctone saudável do TGI, ou seja, a resistência à colonização, a imunomodulação e/ou a contribuição nutricional.

Desde a era Metchnikoff, um vasto número de efeitos benéficos tem sido reportado. A comprovação destes efeitos, com base em estudos *in vitro* e *in vivo* (ensaios clínicos bem controlados), é uma premissa dos órgãos reguladores de alimentos (OMS, FAO, ANVISA), tanto para caracterizar um microrganismo como probiótico, como para regularizar seu uso em alimentos ou fármacos (COSTA; MIGLIORANZA, 2012).

Os principais efeitos benéficos bem estabelecidos por meio da ingestão de probióticos incluem: estabilização da microbiota após o uso de antibióticos, atividade antimicrobiana, propriedades anti-diarreicas, redução do risco de doenças gastrointestinais, melhora no metabolismo da lactose, imunomodulação do sistema imunológico, alívio da constipação e

aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND; 2004; SHAH, 2007). Embora investigações mais aprofundadas sejam necessárias, outros efeitos atribuídos aos probióticos são a redução do colesterol sérico, propriedades antimutagênicas e anticancerígenas (principalmente a diminuição do risco de câncer de cólon), efeitos anti-hipertensivos e melhora nas doenças inflamatórias intestinais, além de redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori* e controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile* (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Adicionalmente, alguns probióticos tem sido definidos como psicobióticos, ou seja, “microrganismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, produzem um efeito benéfico em pacientes com doenças psiquiátricas”. Assim, probióticos ao produzir neurotransmissores podem oferecer uma alternativa de tratamento da depressão e outros transtornos psiquiátricos (DINAN; STANTON; CRYAN, 2013).

Para elucidação dos efeitos benéficos citados, muitos estudos abordam os possíveis mecanismos de ação de probióticos. Apesar da abordagem geral descrita, é importante destacar que alguns efeitos sobre o hospedeiro são espécie e até linhagem dependente.

Naturalmente, a mucosa intestinal forma uma interface entre o corpo e o ambiente luminal, cuja função é permitir a passagem de nutrientes, bem como atuar simultaneamente como barreira frente a microrganismos, toxinas e outras substâncias indesejáveis (CENCICĀ; LANGERHOLC, 2010). As bactérias probióticas devem possuir a habilidade de superar as etapas de passagem pelo TGI e chegar aos receptores do epitélio, onde devem aderir às superfícies da mucosa intestinal. No entanto, os mecanismos de adesão são complexos e ainda não estão completamente elucidados (ISOLAURI; SALMINEN, 2005). Na realidade, a aderência bacteriana pode não ser necessária para observação dos efeitos probióticos, entretanto, qualquer efeito benéfico parece requerer altos números de bactérias viáveis numa administração constante (MARTINS; BARBOSA, 2013).

Quando probióticos aderem à camada mais externa do muco da mucosa ou à partículas de alimentos, formando um biofilme na sua superfície, há competição por sítios de ligação, ou por espaço para adesão entre as bactérias probióticas e os patógenos. Esta competição resulta na exclusão competitiva, ou seja, a aderência das bactérias não-patogênicas nos sítios de ligação da mucosa intestinal forma uma barreira física às bactérias potencialmente patogênicas (COPPOLA; TURNES, 2004).

Acredita-se há anos que a maioria dos efeitos benéficos dos microrganismos probióticos estão concentrados na sua capacidade de suprimir o crescimento de patógenos. De fato, esta interferência na barreira intestinal e, conseqüente competição entre probióticos e bactérias patogênicas por sítios específicos no epitélio intestinal e na camada mucosa subjacente, constitui um mecanismo de ação importante (CLANCY, 2003).

Diferentes preparações probióticas têm demonstrado sucesso no tratamento e prevenção das infecções intestinais incluindo salmoneloses, shigeloses, diarreia induzida por antibióticos e diarreia causada por *C. difficile*, bem como dos distúrbios associados a aumento da permeabilidade intestinal (gastroenterite viral) ou falhas nas funções de barreira da mucosa (MARTINS; BARBOSA, 2013).

Outra hipótese de proteção está relacionada às camadas de muco. Ao longo de todo o epitélio intestinal existem inúmeras células de *Goblet* (células caliciformes) que secretam mucina, uma substância que quando dissolvida em água forma o muco. A camada de muco fornece proteção contra antígenos e moléculas estranhas, sendo a primeira barreira que as bactérias intestinais encontram e na qual os patógenos precisam penetrar durante uma infecção para atingir as células epiteliais (PHILLIPSON et al., 2008).

Os probióticos podem promover o aumento da secreção de muco como um dos mecanismos para melhora da função de barreira e eliminação de patógenos. *In vitro*, algumas espécies de *Lactobacillus* aumentaram a expressão de mucina em células humanas intestinais, bloqueando a invasão e aderência de *Escherichia coli* patogênica (MACK et al., 2003). *In vivo*, os poucos estudos realizados também demonstram uma tendência à indução da expressão de genes de mucina pelos probióticos (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010).

Além dos sítios de adesão, ocorre a competição por nutrientes disponíveis nos nichos ecológicos. Algumas bactérias probióticas possuem a capacidade de comunicação (“*crosstalking*” ou “*quorum sensing*”) com o hospedeiro, onde a bactéria sinaliza o quanto precisa de um dado nutriente e o hospedeiro o produz. Este relacionamento simbiótico impede a superprodução de um determinado nutriente, com criação de nichos ecológicos associados à exclusão de patógenos exógenos (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Finalmente, as bactérias comensais, sobretudo as probióticas, podem inibir o crescimento de patógenos mediante a produção de moléculas antimicrobianas incluindo AGCC e bacteriocinas. As bactérias probióticas podem ainda diminuir o pH luminal por meio

da secreção de ácidos acético e láctico, e com isso inibir o crescimento de alguns bactérias patogênicas, como a *Escherichia coli* enterohemorrágica (COLLINS; BERCIK, 2009).

Desse modo, os probióticos exercem efeitos diretos ou indiretos sobre a microbiota comensal e/ou sobre patógenos, mediante a prevenção de infecções e inflamações, modulação do sistema imune (por meio da interação com folículos linfóides), promoção do aumento de anticorpos (como IgA e IgG), produção de citocinas (proteínas que modulam a função de outras células) e, por fim, o restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal (COSTA, 2011).

### 1.3 ABORDAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR), o aumento do número de sequências disponíveis em bancos de dados, bem como o incremento de novos métodos moleculares têm adquirido grande importância e abrem novos caminhos nas abordagens que visam a compreensão da microbiota intestinal. Assim, as abordagens moleculares independentes de cultura constituem uma alternativa e/ou complemento importante aos métodos tradicionais de cultivo, na avaliação da microbiota do TGI humano, os quais permitem o estudo da diversidade microbiana e a identificação de microrganismos ainda desconhecidos e não identificados (ZOETENDAL et al., 2004; LOZUPONE et al., 2012).

Em conjunto a tais abordagens, a facilidade de acesso a dados genômicos relacionados a microrganismos têm aumentado o conhecimento sobre a diversidade da comunidade microbiana do TGI, bem como os mecanismos pelos quais os probióticos podem influenciar a homeostase intestinal (CAREY et al., 2007; COSTA et al., 2011).

Nesse contexto, marcadores moleculares vêm sendo empregados com sucesso em estudos que avaliam sequências de genes para genotipagem de microrganismos. Abordagens envolvendo o RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo (SSU) permitiram uma maior expansão do conhecimento sobre a diversidade da microbiota do TGI, especialmente a microbiota fecal (ZOETENDAL; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2008).

### 1.3.1 O Gene 16S RNA Ribossomal como Marcador Molecular

O ribossomo é uma das organelas mais abundantes na célula e contém tipicamente cerca de 80% do RNA celular total. Sua estrutura consiste em duas subunidades, uma grande e uma pequena, e cada uma possui um ou mais trechos de RNA e várias proteínas. Os três genes de RNA ribossomal (rRNA 23S, rRNA 16S e rRNA 5S) presentes nas bactérias, estão organizados em um agrupamento de genes que correspondem a um operon, o qual é expresso como único RNA (após a síntese do RNA, este é processado nos diferentes biopolímeros - rRNA 23S, rRNA 16S e rRNA 5S). Os operons de rRNA podem ser representados por uma única cópia ou apresentar-se em múltiplas cópias no genoma (WOESE, 1977). Segundo Kleerebezem e colaboradores (2003), o *L. plantarum* possui 5 cópias do gene 16S rRNA.

Devido ao fato de ser essencial para a sobrevivência das espécies bacterianas, a região do gene 16S rRNA é altamente conservada em todas estas. Por esse motivo, esse gene é adequado para estudos de diversidade, sendo composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos e dotado de sequências conservadas (regiões universais) bem como regiões variáveis, com variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar as relações filogenéticas entre as espécies. Limitações funcionais sobre a estrutura de sequências gênicas do rRNA fazem com que certas regiões no gene sejam conservadas, enquanto as sequências entre estas regiões conservadas mutam em taxas mais rápidas, sendo assim denominadas regiões variáveis (PEI et al., 2009).

Em geral, o gene 16S rRNA contém nove "regiões hipervariáveis" que podem revelar a diversidade de sequências entre diferentes espécies bacterianas e pode ser usado para sua identificação. Essas regiões variáveis são flanqueadas por trechos conservados na maioria das bactérias, o que permite a amplificação por PCR de sequências alvos por meio de oligonucleotídeos iniciadores "universais" ou específicos para genomas bacterianos (CHAKRAVORTY et al., 2007).

As sequências de DNA, como a região do RNA ribossomal, podem ser obtidas diretamente de uma amostra sem necessidade de procedimentos de cultura, o que permite a detecção de basicamente todos os membros do ecossistema, incluindo aqueles que não são culturáveis (ZOETENDAL; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2008). Inúmeros estudos utilizam este gene na elucidação da diversidade e em estudos filogenéticos envolvendo microrganismos.

Por ser considerado um marcador molecular seguro e aceito pela comunidade científica, seu sequenciamento - determinação da cadeia de nucleotídeos que compõe o DNA - a partir de ecossistemas, tornou-se um método padrão para se determinar a composição da comunidade microbiana. Em função disso, bancos de dados específicos para o gene 16S rRNA, como o Ribosomal Database Project II (RDP), foram criados e encontram-se disponíveis para pesquisa e consulta (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (COLE et al., 2009). Atualmente, o RDP II conta com 2.809.406 sequências de rRNAs depositadas (acessado em 17 de fevereiro de 2014). Além deste, comparações podem ser realizadas com bancos de dados gerais, como o *GenBank*, que permite a determinação por comparação da sequência obtida com outras de diferentes microrganismos (de sequência similar).

#### 1.4 METAGENÔMICA

Os primeiros estudos de genomas que utilizaram procedimentos de sequenciamento foram realizados no meio da década de 1970 (PEIXOTO, 2013). Desde então foram desenvolvidas técnicas de sequenciamento mais eficientes e os genomas de milhares de espécies se encontram depositados em bancos de dados, onde ferramentas de pesquisa como o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) permitem a busca e comparação de sequências com aquelas já existentes nesses bancos.

Graças a essas novas tecnologias de sequenciamento, foi amplamente facilitada a obtenção de informação genômica a partir de amostras de DNA isoladas diretamente de comunidades microbianas. Estes dados de sequências de DNA retirados de um ecossistema, os quais constituem seu genoma microbiano coletivo, são denominados metagenoma (WOOLEY; GODZIK; FRIEDBERG, 2010).

O termo metagenoma foi pioneiramente aplicado por Handelsman e colaboradores (1998) e faz referência ao conceito estatístico de meta-análise, processo de combinar estatisticamente análises separadas, correspondendo à combinação da análise de múltiplos genomas. A análise funcional ou baseada em sequência desses múltiplos genomas tem sido principalmente denominada “metagenômica”.

Dessa forma, a metagenômica pode ser definida resumidamente como “o estudo genético de uma amostra retirada de um ecossistema”, sendo a mais nova e importante

abordagem no contexto das ferramentas de análise de comunidades microbianas (SEKIROV et al., 2010).

Importante destacar que o estabelecimento dessa abordagem provocou uma revolução no estudo da diversidade de comunidades microbianas. Com sua aplicação foi possível o acesso ao genoma de uma maior variedade de microrganismos que não haviam sido isolados em meio de cultura. Assim, a metagenômica caracteriza-se por elucidar os genomas de organismos não cultiváveis e, em função da vasta diversidade microbiana, pode ser conduzida em grande escala (HANDELSMAN, 2005).

Obtidas as informações a partir da análise de metagenomas, a diversidade de uma comunidade pode ser determinada, assim como a presença de microrganismos específicos ou dominantes e/ou a simples presença de um gene (HANDELSMAN, 2005). Para isso, o desenvolvimento da bioinformática - um ramo da biologia que consiste na criação, desenvolvimento e operação de ferramentas computacionais para coletar, organizar e interpretar dados - tem sido determinante, já que permite o processamento e análise da grande quantidade de dados gerada pelas técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS).

A primeira etapa de uma análise metagenômica envolve a comparação das sequências obtidas com um banco de dados de sequências previamente conhecidas e identificadas. Esta etapa, em especial, implica na necessidade de um grande “poder” computacional, no entanto, fornece os dados básicos para todas as análises subsequentes como filogenia, análise funcional e reconstruções metabólicas (MEYER et al., 2008).

O servidor Metagenomics RAST - *MetaGenome Rapid Annotation using Subsystem Technology* (MG-RAST) fornece um sistema computacional de alto desempenho para anotação de dados, o que permite uma forma de armazenar, disponibilizar e interagir com o grande volume de informações geradas pelos projetos metagenômicos (MEYER et al., 2008).

Antes do envio de dados para análise o servidor solicita ao usuário o preenchimento de um arquivo de Metadados, que segue os padrões do *Minimum Information about a Genome Sequence* (MIGS) proposta pelo *Genomics Standards Consortium* (FIELD et al. 2008) , com informações básicas sobre as sequências a serem enviadas, o que permite a rápida identificação de amostras distintas, seus locais e datas de coleta.

Após o envio as sequências brutas são submetidas a um fluxo de trabalho onde são normalizadas e processadas pelo servidor RAST, o qual executa uma série de ferramentas de bioinformática, e dessa forma, fornece a anotação para fragmentos de sequências, suas

classificações filogenéticas e uma reconstrução metabólica inicial pela execução do SEED (*comparative genomics environment*), um sistema criado para genômica comparativa. Os parâmetros padrões utilizados para as ferramentas de bioinformática envolvidas no fluxo de trabalho foram estabelecidos por testes que buscaram a melhor relação entre especificidade e precisão (MEYER et al., 2008). Ao final do processo o usuário tem acesso aos diversos tipos de dados disponibilizados no servidor através de uma interface web que permite que os dados derivados sejam alterados dinamicamente pelo usuário.

Atualmente, o servidor abriga 370 bilhões de sequências e mais de 100 mil metagenomas (acessado em 24 de fevereiro de 2014). Investigações sobre a microbiota fecal humana tem utilizado o MG-RAST para análise de suas sequências de DNA ou armazenamento público dessas para análises posteriores (TURNBAUGH et al., 2009a; GUPTA et al., 2011; SCHWARTZ et al., 2012; YATSUNENKO et al., 2012).

Nos é importante salientar que, como qualquer outra técnica recente, a metagenômica pode estar sujeita a certos vieses. Os fatores amostragem, estocagem das amostras e extração de DNA podem influenciar os resultados obtidos. Além disso, a amplificação do gene 16S rRNA, ou uma região deste, por PCR é considerada uma etapa crítica, onde o uso de diferentes oligonucleotídeos iniciadores pode levar a uma representação desigual de certos grupos bacterianos (GUEIMONDE; COLLADO, 2012).

Por exemplo, em inúmeros estudos metagenômicos as sequências de bifidobactérias estão ou ausentes ou presentes em baixos níveis, enquanto por outros métodos esses microrganismos aparecem ser presentes em níveis relativamente altos na mesma amostra (CLAESSON et al., 2009; GUEIMONDE; COLLADO, 2012). Nas investigações de Khachatryan e colaboradores (2008) e Hill e colaboradores (2010) as bifidobactérias foram consideravelmente sub-representadas em seus estudos metagenômicos da comunidade fecal humana.

#### 1.4.1 Sequenciadores de Nova Geração

Simultaneamente ao método químico de degradação de bases desenvolvido por Maxam e Gilbert, a tecnologia de sequenciamento foi descrita por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), como um método para a determinação precisa da sequência de nucleotídeos em uma

molécula de DNA. Este método enzimático baseado no princípio de término de cadeia por didesoxinucleotídeos constituiu-se como o procedimento padrão ao longo dos 30 anos que se seguiram à sua publicação original.

Apesar de sua simplicidade, eficiência e evolução (sequenciamento automático), as limitações do método clássico de ‘Sanger’ tornaram-se cada vez mais evidentes, como por exemplo, o alto custo do sequenciamento por pares de base e a necessidade de etapas prévias de clonagem. Dessa forma, novas tecnologias automatizáveis em escala de altíssima eficiência (*high-throughput*) foram desenvolvidas para racionalizar e diminuir o tempo de sequenciamento de genomas.

No sentido de se produzir sequências de forma ainda mais massiva, o sequenciamento de nova geração (NGS), tem aumentado significativamente nosso conhecimento sobre a diversidade microbiana e sua função em ecossistemas microbianos complexos, como o TGI humano (KUCZYNSKI et al., 2011). Com a redução de tempo para gerar uma sequência de DNA, várias aplicações foram aprimoradas ou originalmente desenvolvidas, como o sequenciamento de novos genomas, estudos metagenômicos, identificação de regiões de interação entre DNA-proteína (ChIP-seq), caracterização do transcriptoma de genomas inteiros (RNA-seq), descoberta de RNAs não codificantes (nc-RNAs) e ainda o estudo de amostras de DNA de fósseis (paleogenômica) (WHITELEY et al., 2012).

Os novos equipamentos, denominados sequenciadores de nova geração (NGS) ou ainda sequenciadores maciçamente paralelos, estão revolucionando o campo do sequenciamento genômico, pois permitem explorar e responder questões biológicas com uma velocidade e precisão nunca antes atingida. Cada uma das novas plataformas de sequenciamento apresenta sua própria metodologia de sequenciamento, no entanto, uma característica em comum entre todas as máquinas, é a capacidade de gerar uma grande quantidade de dados em um período muito curto (POP; SALZBERG, 2008).

Em 2004, a plataforma de sequenciamento 454 (Roche, Connecticut, Estados Unidos da América) foi o primeiro NGS introduzido no mercado. O princípio do pirosequenciamento é aplicado, onde uma cascata de reações enzimáticas iniciadas pela liberação de um pirofosfato durante reação de incorporação de um nucleotídeo na cadeia nascente pela DNA polimerase gera ao final do processo um sinal de luz que é capturado por uma câmera que faz parte do sequenciador. Dois anos após (2006), a plataforma de sequenciamento Illumina (Illumina, San Diego, Estados Unidos da América) foi lançada no mercado com a capacidade

de gerar simultaneamente milhões de leituras curtas de DNA, o que permite o sequenciamento de um bilhão de bases nucleotídicas em uma única corrida (POP; SALZBERG, 2008).

Entretanto, até poucos anos atrás, o sequenciamento de DNA por meio desses sequenciadores de nova geração era limitado por uma série de fatores que dificultavam o acesso ao sequenciamento em larga escala dentro da maioria dos laboratórios. Os fatores limitantes incluíam a necessidade de suporte para a instalação de plataformas complexas, aquisição de equipamentos iniciais de grande porte e um custo contínuo com as análises (a maioria dos sequenciadores depende de sistemas caros de emissões de luz) (WHITELEY et al., 2012). Dessa forma, vários laboratórios pequenos e médios eram impossibilitados de adotar essa nova tecnologia “em casa”.

Recentemente, foi lançada a primeira plataforma de sequenciamento que realiza a detecção de bases sem se apoiar em emissões de luz geradas durante o processo de identificação de bases. A detecção “não óptica” das sequências de DNA é realizada pela plataforma Ion Torrent *Personal Genome Machine* (PGM) (Life Technologies, São Francisco, Estados Unidos da América) (ROTHBERG et al., 2011).

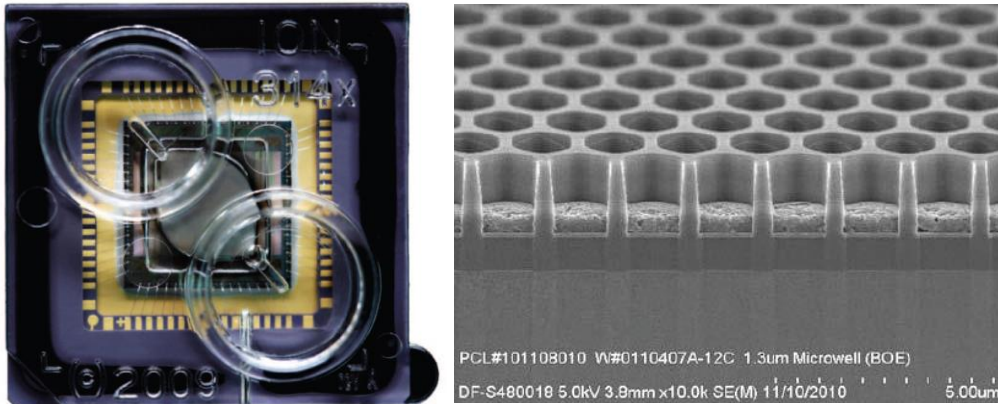
#### 1.4.1.1 Plataforma Ion Torrent PGM

O sequenciamento nessa nova plataforma ocorre de maneira cíclica, sendo baseado na alteração de pH da solução onde ocorre a reação de sequenciamento. Para isso, Rothberg e colaboradores (2011) criaram o primeiro dispositivo comercialmente disponível - um chip de sílica semicondutor - capaz de traduzir sinais químicos em informação digital.

Como resultado, é possível realizar um sequenciamento de produtos de PCR (*amplicons*) sem a utilização de luz e, conseqüentemente, mais rápido, mais escalável e de menor custo (WHITELEY et al., 2012).

O sequenciador é o próprio chip que possui milhares de poços nanoscópicos (Fig. 8) e pode gerar 10 Mb (Ion 314™ Chip), 100 Mb (Ion 316™ Chip) ou 1Gb (Ion 318™ Chip) de sequências. Adicionalmente, o dispositivo é composto principalmente por leitores e sensores eletrônicos, um microprocessador para processamento do sinal e um sistema de fluidos para controlar o fluxo de reagentes sobre o chip (ROTHBERG et al., 2011).

**Figura 8.** Ion 314™ Chip. A forma elíptica cinzenta no centro contém 1.4 milhões de micropoços nanoscópicos (à direita) que registram a reação de sequenciamento.



Fonte: Rothberg et al. (2011).

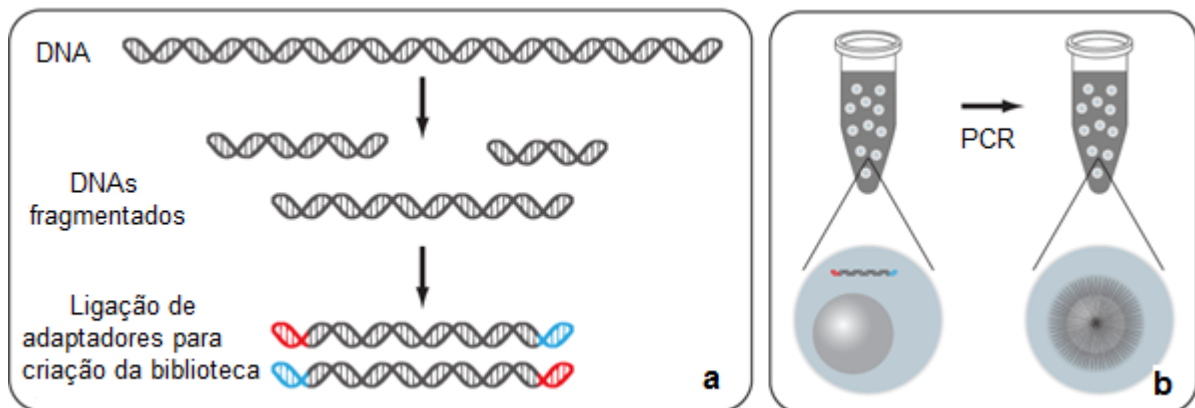
O primeiro passo do fluxo de trabalho é a criação de uma biblioteca genômica a partir da fragmentação dos *amplicons* (via sonicação) e ligação de adaptadores Ion Torrent em seus terminais (Fig. 9a). Em seguida, esse *pool* de fragmentos (insertos) de cada amostra da biblioteca é clonalmente amplificado em *Ion Spheres* (microesferas de material sintético ou *beads*). As microesferas que contém as amostras de DNA molde acopladas são então enriquecidas e oligonucleotídeos iniciadores e a DNA polimerase são ligados à elas. Após a etapa de PCR em emulsão (Fig. 9b), é realizada a adição dos reagentes para a reação de sequenciamento paralelo massivo e as *beads* com seu fragmento amplificado são depositadas no chip por uma etapa de centrifugação. Cada micropoço possui a dimensão suficiente para que apenas uma microesfera possa ser nele depositado (ROTHBERG et al., 2011).

A química do sequenciamento em si é simples. Naturalmente, um próton é liberado (proveniente da hidrólise do trifosfato) quando um nucleotídeo é incorporado pela DNA polimerase na cadeia nascente de DNA, o que resulta em uma alteração do pH da solução.

No sequenciamento de íon os quatro nucleotídeos preenchem o chip sucessivamente, um após o outro. Quando um nucleotídeo do fluxo é complementar à sequência da fita de DNA em um micropoço particular, este é incorporado na cadeia nascente pela polimerase que foi previamente ligada ao sistema. Tal incorporação resulta na hidrólise do trifosfato desse nucleotídeo, provocando a liberação de um único próton para cada nucleotídeo ligado durante o fluxo. Esta liberação produz uma mudança no pH da solução proporcional ao número de nucleotídeos incorporados (0.02 unidades de pH por cada incorporação de base). A alteração é

detectada pelo sensor de íon localizado abaixo de cada micropoço e convertida em uma voltagem. Se existem duas bases idênticas complementares à fita de DNA, a voltagem é dobrada e o chip reconhece as duas bases idênticas (Fig. 10). Se o próximo nucleotídeo preenchido ao chip não for compatível, não haverá mudança na voltagem e nenhuma base será reconhecida. Devido a esta característica de detecção direta e conexão da informação química para a digital, sem necessidade de câmeras ou luz, cada incorporação de nucleotídeo é medida em segundos, o que permite corridas com um período muito mais curto (aproximadamente 2 horas) (ROTHBERG et al., 2011).

**Figura 9.** Sequenciamento no Ion Torrent: a) Preparação da biblioteca genômica: o DNA é fragmentado e adaptadores *forward* e *reverse* são ligados aos fragmentos. b) Cada fragmento é ligado a uma microesfera e clonado por amplificação pela PCR.



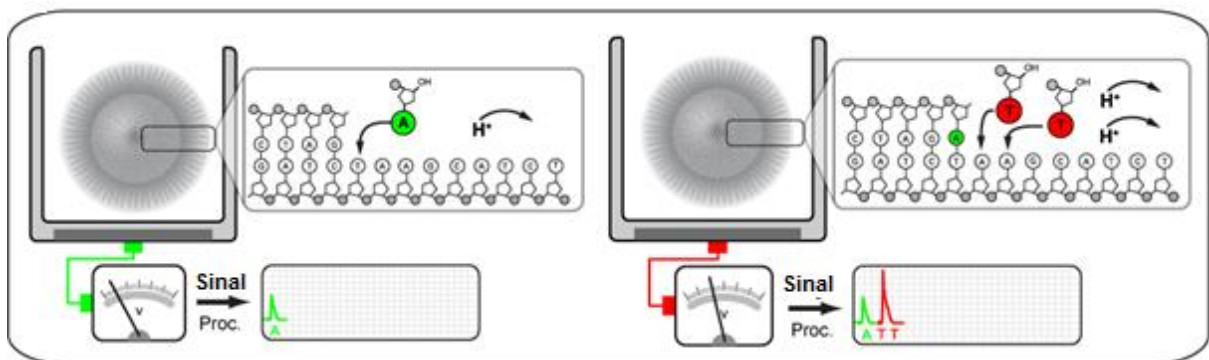
Fonte: adaptado de Rothberg et al. (2011).

Uma vez gerados os dados no sequenciador, estes são automaticamente transferidos para o Servidor Torrent onde programas específicos são capazes de transformar os sinais químicos em sequências de bases com geração das sequências individuais (leituras).

Aplicações da tecnologia Ion Torrent baseadas no sequenciamento do gene 16S rRNA foram observadas nas investigações a respeito da comunidade microbiana aquática de rios (YERGEAU et al., 2012), comunidade bacteriana e de arqueas presentes em uma lagoa anaeróbia utilizada para tratamento de resíduos (WHITELEY et al., 2012) e na determinação da população bacteriana residente na placa subgingival de humanos (JUNEMANN et al., 2012).

Milani e colaboradores (2013), descreveram um protocolo otimizado para o estudo da microbiota fecal humana, por meio da utilização do gene 16S rRNA como marcador molecular e a plataforma Ion Torrent, uma vez que os avanços na determinação de ecossistemas complexos são dependentes do desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento, como o sequenciamento de íon.

**Figura 10.** Sequenciamento no Ion Chip: oligonucleotídeos iniciadores e a DNA polimerase são ligados às microesferas e estas são depositadas no chip (uma em cada micropoço); todos os quatro nucleotídeos preenchem o chip ciclicamente. No processamento de sinais, o software converte os dados em medidas de incorporação em cada micropoço para cada nucleotídeo sucessivo do fluxo. Após as bases determinadas, cada leitura é passada através de um filtro para exclusão das leituras com baixa precisão.



Fonte: adaptado de Rothberg et al. (2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Verificar o impacto da ingestão da bactéria *Lactobacillus plantarum* Lp-115 sobre a composição da microbiota fecal de indivíduos saudáveis por meio de abordagem metagenômica.

## 2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar essencialmente a microbiota bacteriana presente nas amostras fecais de dois humanos adultos;
- Verificar a presença de *L. plantarum* como microbiota alóctone nas fezes durante e pós-consumo de um leite fermentado por este microrganismo;
- Analisar o efeito da ingestão do microrganismo alvo sobre a microbiota fecal, ou seja, se este altera o balanço microbiano dos indivíduos submetidos a terapia probiótica.

## REFERÊNCIAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Resolução RDC nº 278, de 22 de setembro de 2005, atualizada em Julho de 2008. Legislação para alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 07 mar. 2013.
- ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; FERNANDES, G. R.; TAP, J.; BRULS, T.; BATTO, J.; BERTALAN, M.; BORRUEL, N.; CASELLAS, F.; FERNANDEZ, L.; GAUTIER, L.; HANSEN, T.; HATTORI, M.; HAYASHI, T.; KLEEREBEZEM, M.; KUROKAWA, K.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; MANICHANH, C.; NIELSEN, B.; NIELSEN, T.; PONS, N.; POULAIN, J.; QIN, J.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TIMS, S.; TORRENTS, D.; UGARTE, E.; ZOETENDAL, E. G.; WANG, J.; GUARNER, F.; PEDERSEN, O.; DE VOS, W. M.; BRUNAK, S.; DORE, J. METAHIT CONSORTIUM; WEISSENBACH, J.; EHRlich, D.; BORK, P. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**. v. 473, p. 174-180, 2011.
- BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**. v. 307. p. 1915-1919, 2005.
- BARRETO, F. M.; SIMÃO, A. C.; MORIMOTO, H. K.; LOZOVYOY, M. B.; DICI, I.; MIGLIORANZA, L. H. S. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome: a pilot study. **Nutrition**. 2014.
- BARTOSCH, S.; FITE, A.; MACFARLANE, G. T.; MCMURDO, M. T. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 6, p. 3575-3581, 2004.

BARTOSCH, S.; WOODMANSEY, E. J.; PATERSON, J. C. M.; MCMURDO, M. E. T.; MACFARLANE, G. T. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time Polymerase Chain Reaction and counting of viable bacteria. **Clinical Infectious Diseases**. v. 40, p. 28-37, 2005.

BERGER, B.; PRIDMORE, D.; BARRETTO, C.; DELMAS-JULIEN, F.; SCHREIBER, K.; ARIGONI, F.; BRÜSSOW, H. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. **Journal of Bacteriology**. v. 189, n 4, p. 1311-1321, 2007.

BERTAZZONI, E.; DONELLI, G.; MIDTVEDT, T.; NICOLI, J.; SANZ, Y. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? **Journal of Chemotherapy**. v. 25, n. 4, p. 193-212, 2013.

BEVINS, C. L.; SALZMAN, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, n. 5, p. 356-368, 2011.

BOTTAZI, V. Food and feed production with microorganisms. **Biotechnology**. v. 5, p. 315-363, 1983.

BUJALANCE, C.; MORENO, E.; VALERA, M.; BRAVO, A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, p. 28 -34, 2007.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; COSTELLO, E. K.; BERG-LYONS, D.; GONZALEZ, A.; STOMBAUGH, J.; KNIGHTS, D.; GAJER, P.; RAVEL, J.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Moving pictures of the human microbiome. **Genome Biology**. v. 12, n. 50, p. 1-8, 2011b.

CAREY, C. M.; KIRK, J. L.; OJHA, S.; KOSTRZYNSKA, M. Current and future uses of real time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 53, p. 537-550, 2007.

CENCIĆ, A.; LANGERHOLC, T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, p. 4-14, 2010.

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v. 69, p. 330–339, 2007.

CLAESSON, M. J.; SINDEREN, D.; O'TOOLE, P.W. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiology Letters**. v. 269, p. 22-28, 2007.

CLAESSON, M. J.; O'SULLIVAN, O.; WANG, Q.; NIKKILÄ, J.; MARCHESI, J. R.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. L. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. **Plos One**. v. 4, i. 8, e6669, 2009.

CLAESSON, M. J.; CUSACK, S.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; WEERD, H.; FLANNERY, E.; MARCHESI, J. R.; FALUSH, D.; DINAN, T.; FITZGERALD, G.; STANTON, C.; SINDEREN, D.; O'CONNOR, M.; HARNEDY, N.; O'CONNOR, K.; HENRY, C.; O'MAHONY, D.; FITZGERALD, A. P.; SHANAHAN, F.; TWOMEY, C.; HILL, C.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W. Composition, variability and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 108, p. 4586-4591, 2011.

CLANCY, R. Immunobiotics and the probiotic evolution. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 38, p. 9-12, 2003.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAMSYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**. v. 37, p. 141-145, 2009.

COLLINS, S. M.; BERCIK, P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. **Gastroenterology**. v. 136, p. 2003-2014, 2009.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**. v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

COSTA, G. A. N. **Identificação e monitoramento de *Lactobacillus plantarum* em alimentos e humanos com uso de ferramentas moleculares**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

COSTA, G. N.; VILAS-BÔAS, G. T.; VILAS-BOAS, L. A.; MIGLIORANZA, L. H. S. *In silico* phylogenetic analysis of lactic acid bacteria and new primer set for identification of *Lactobacillus plantarum* in food samples. **European Food Research Technology**. v. 233, n. 2, p. 233-241, 2011.

COSTA, G. N.; MIGLIORANZA, L. H. S. Probiotics: The effects on human health and current prospects. In: RIGOBELLO, E. C. Probiotics. Croatia: InTech, 2012. p. 367-380.

COSTA, G. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; VILAS-BÔAS, G. T.; MATSUO, T.; MIGLIORANZA, L. H. S. Potential fate of ingested *Lactobacillus plantarum* and its occurrence in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 80, n. 3, p. 1013-1019, 2014.

COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**. v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 2009.

- DAVID, L. A.; MAURICE, C. F.; CARMODY, R. N.; GOOTENBERG, D. B.; BUTTON, J. E.; WOLFE, B. E.; LING, A. V.; DEVLIN, A. S.; VARMA, Y.; FISCHBACH, M. A.; BIDDINGER, S. B.; DUTTON, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**. v. 505, p. 559-563, 2014.
- DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINIE, 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**. v. 107, n. 33, p. 14691-14696, 2010.
- DE VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 1018-1028, 2006.
- DELGADO, S.; SUÁREZ, A.; MAYO, B. Bifidobacterial diversity determined by culturing and by 16s rDNA sequence analysis in feces and mucosa from ten healthy spanish adults. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 51, p. 1878-1885, 2006.
- DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. **Nature**. v. 449, p. 811-818, 2007.
- DICKSVED, J.; HALFVARSON, J.; ROSENQUIST, M.; JÄRNEROT, G.; TYSK, C.; APAJALAHTI J.; ENGSTRAND, L.; JANSSON, J. K. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. **The ISME Journal**. v. 2, p. 716-727, 2008.
- DINAN , T. G.; STANTON, C.; CRYAN, J. F. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. **Biological Psychiatry**. v. 74, i. 10, p. 720-726, 2013.
- DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; COSTELLO, E. K.; CONTRERAS, M.; MAGRISD, M.; HIDALGO, G.; FIERERE, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, n. 26, p. 11971-11975, 2010.
- DUNCAN, S. H.; LOBLEY, G. E.; HOLTROP, G.; INCE, J.; JOHNSTONE, A. M.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International Journal of Obesity**. v. 32, p. 1720-1724, 2008.
- DUPONT, A. W.; DUPONT, H. L. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v. 8, p. 523-531, 2011.
- ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEINS, C. N.; PURDON, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**. v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.
- FAO - Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. (2006). Report of a Joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 2001.

FAVIER, C. F.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 1, p. 219–226, 2002.

FEENEY, A.; SLEATOR, R. D. The human gut microbiome: the ghost in the machine. **Future Microbiology**. v. 7, n. 11, p. 1235-1237, 2012.

FIELD, D.; GARRITY, G.; GRAY, T.; MORRISON, N.; SELENGUT, J.; STERK, P.; TATUSOVA, T.; THOMSON, N.; ALLEN, M. J.; ANGIUOLI, S. V.; ASHBURNER, M.; AXELROD, N.; BALDAUF, S.; BALLARD, S.; BOORE, J.; COCHRANE, G.; COLE, J.; DAWYNDT, P.; DE VOS, P.; DEPAMPHILIS, C.; EDWARDS, R.; FARUQUE, N.; FELDMAN, R.; GILBERT, R.; GILNA, P.; GLÖCKNER, F. O.; GOLDSTEIN, P.; GURALNICK, R.; HAFT, D.; HANCOCK, D.; HERMJAKOB, H.; HERTZ-FOWLER, C.; HUGENHOLTZ, P.; JOINT, I.; KAGAN, L.; KANE, M.; KENNEDY, J.; KOWALCHUK, G.; KOTTMANN, R.; KOLKER, E.; KRAVITZ, S.; KYRPIDES, N.; LEEBENS-MACK, J.; LEWIS, S.; LI, K.; LISTER, A.; LORD, P.; MALTSEV, N.; MARKOWITZ, V.; MARTINY, J.; METHE, B.; MIZRACHI, I.; MOXON, R.; NELSON, K.; PARKHILL, J.; PROCTOR, L.; WHITE, O.; SANSONE, S.; SPIERS, A.; STEVENS, R.; SWIFT, P.; TAYLOR, C.; TATENO, Y.; TETT, A.; TURNER, S.; USSERY, D.; VAUGHAN, B.; WARD, N.; WHETZEL, T.; GIL, I.; WILSON, G.; WIPAT, A. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. **Nature Biotechnology**. v. 26, p. 541 – 547, 2008.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I.; QUIJANO, G.; RAMÍREZ, G.; CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, p. 1341–1348, 2011.

FRANK, D. N.; AMAND, A. L.; FELDMAN, R. A.; BOEDEKER, N. H.; HARPAZ, N.; PACE, N. R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, n. 34, p. 13780-13785, 2007.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.

FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut**. v. 55, p. 141-143, 2006.

GOOSSENS, D. M.; JONKERS, D. E.; RUSSEL, M. M.; STOBBERINGH, E. E.; STOCKBRÜGGER, R. W. The effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 23, p. 255-263, 2006.

GOUGH, E.; SHAIKH, H.; MANGES, A. R. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. **Clinical Infectious Diseases**. v. 53, p. 994–1002, 2011.

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

GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. **Digestive and liver disease**. v. 38, p. 242-247, 2006.

GUEIMONDE, M.; COLLADO, M. C. Metagenomics and probiotics. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, p. 32–34, 2012.

GUPTA, S. S.; MOHAMMED, M. H.; GHOSH, T. S.; KANUNGO, S.; NAIR, G. B.; MANDE, S. S. Metagenome of the gut of a malnourished child. **Gut Pathogens**. v. 3, n. 7, 2011.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**. v. 5, p. 245-249, 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics or Megagenomics? **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, p. 457-458, 2005.

HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. **Microbiology Immunology**. v. 47, n. 8, p. 557-570, 2003.

HILL, J. E.; Fernando, W. U.; ZELLO, G. A.; TYLER, R. T.; DAHL, W. J.; KESSEL, A. V. Improvement of the representation of bifidobacteria in fecal microbiota metagenomic libraries by application of the *cpn60* universal primer cocktail. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 13, p. 4550-4552, 2010.

HUGENSCHMIDT, S.; SUSANNE MIESCHER SCHWENNINGER, NICOLE GNEHM, CHRISTOPHE LACROIX. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. **International Dairy Journal**. v. 20, n. 12, p. 852-857, 2010.

ISMAIL, N. A.; RAGAB, S. H.; ELBAKY, A. A.; SHOEIB, A. R. S.; ALHOSARY, Y.; FEKRY, D. Frequency of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Archives of Medical Science**. n. 7, v. 3, p. 501-507, 2011.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Gut Inflammation and Barrier Function. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 34, p. 437-450, 2005.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products - challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 21, p. 175–181, 2010.

JUNEMANN, S.; PRIOR, K.; SZCZEPANOWSKI, R.; HARKS, I.; EHMKE, B.; GOESMANN, A.; STOYE, J.; HARMSSEN, D. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by Ion Torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. **Plos One**. v. 7, i. 8, e41606, 2012.

KHACHATRYAN, Z. A.; KTSOYAN, Z. A.; MANUKYAN, G. P.; KELLY, D.; GHAZARYAN, K. A.; AMINOV, R. I. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. **Plos One**. v. 3, i. 8, e3064, 2008.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O.P.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S.A.; SANDBRINK, H. M.; FIERS, M. W.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R. M.; BRON, P.A.; HOFFER, S. M.; GROOT, M.N.; KERKHOVEN, R.; DE VRIES, M.; URSING, B.; DE VOS, W.M.; SIEZEN, R. J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, n. 4, p. 1990 -1995, 2003.

KOENIG, J. E.; SPOR, A.; SCALFONE, N.; FRICKER, A. D.; STOMBAUGH, J.; KNIGHT, R.; ANGENENT, L. T.; LEY, R. E. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 108, p. 4578-4585, 2011.

KOREN, O.; GOODRICH, J. K.; CULLENDER, T. C.; SPOR, A.; LAITINEN, K.; BÄCKHED, H. K.; GONZALEZ, A.; WERNER, J. J.; ANGENENT, L.T.; KNIGHT, R.; BÄCKHED, F.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; LEY, R. E. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. **Cell**. v. 150, p. 470-480, 2012.

KUCZYNSKI, J.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; PARFREY, L. W.; CLEMENTE, J.C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. **Nature Reviews Genetics**. v. 13, p. 47-58, 2011.

LEE, D. K.; JANG, S.; BAEK, E. H.; KIM, M. J.; LEE, K. S.; SHIN, H. S.; CHUNG, M. J.; KIM, J. E.; LEE, K.; HA, N. J. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. **Lipids in Health and Disease**. v. 8, n.21, p. 1-8, 2009.

LEPAGE, P.; SEKSIK, P.; SUTREN, M.; DE LA COCHETIÈRE, M. F.; JIAN, R.; MARTEAU, P.; DORÉ, J. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. **Inflammatory Bowel Diseases**. v. 11, n. 5, p. 473-80, 2005.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**. v. 124, p. 837-848, 2006.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial Ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature - Brief Communications**. v. 444, p. 1022-1023, 2006.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**. v. 489, p. 220-230, 2012.

MACK, D.R.; AHRNE, S.; HYDE, L.; WEI, S.; HOLLINGSWORTH, M.A. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**. v. 52, p. 827-833, 2003.

- MANICHANH, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; BONNAUD, E.; GLOUX, K.; PELLETIER, E.; FRANGEUL, L.; NALIN, R.; JARRIN, C.; CHARDON, P.; MARTEAU, P.; ROCA, J.; DORE, J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**. v. 55, p. 205-211, 2006.
- MARIAT, D.; FIRMESSE, O.; LEVENZES, F.; GUIMARÃES, V. D.; SOKOL, H.; DORÉ, J.; CORTIER, G.; FURET, J. P. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. **BioMed Central Microbiology**. v. 9, n. 23, p. 1-6, 2009.
- MARTÍNEZ, I.; MULLER, C. E.; WALTER, J. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. **Plos One**. v. 8, i. 7, e69621, 2013.
- MARTINS, F. S.; TIAGO, F. P.; BARBOSA, F. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, n. 2, 2005.
- MARTINS, F. S.; SILVA, A. A.; VIEIRA, A. T.; BARBOSA, F. F.; ARANTES, R. E.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**. v. 191, p. 623-630, 2009.
- MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F. O gênero *Salmonella* e os probióticos. **Arquivo Brasileiro de Microbiologia Básica e Aplicada**. v. 1, n. 1, p. 24-34, 2013.
- McNULTY, N. P.; YATSUNENKO, T.; HSIAO, A.; FAITH, J. J.; MUEGGE, B. D.; GOODMAN, A. L.; HENRISSAT, B.; OOZEER, R.; COOLS-PORTIER, S.; GOBERT, G.; CHERVAUX, C.; KNIGHTS, D.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R.; DUNCAN, A. E.; BAIN, J. R.; MUEHLBAUER, M. J.; NEWGARD, C. B.; HEATH, A. C.; GORDON, J. I. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. **Science Translation Medicine**. v. 106, n. 3, 2011.
- MEYER, F.; PAARMANN, D.; SOUZA, M. D.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**. v. 9, n. 386, 2008.
- MILANI, C.; HEVIA, A.; FORONI, E.; DURANTI, S.; TURRONI, F.; LUGLI, G. A.; SANCHEZ, B.; MARTÍN, R.; GUEIMONDE, M.; VAN SINDEREN, D.; MARGOLLES, A.; VENTURA, M. Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16s rRNA gene-based analysis protocol. **Plos One**. v. 8, i. 7, e68739, 2013.
- NARUSZEWICZ, M.; JOHANSSON, M. L.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; BUKOWSKA, H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 76, p. 1249-1255, 2002.
- NEEF, A.; SANZ, Y. Future for probiotic science in functional food and dietary supplement development. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 16, p. 679-687, 2013.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: Castro, L. P.; Coelho, L. V. **Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 2004. p. 1037-1047.

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. **The Scientific World Journal**. v. 7, p. 31-46, 2007.

O'SULLIVAN, O.; COAKLEY, M.; LAKSHMINARAYANAN, B.; CONDE, S.; CLAEISSON, M. J.; CUSACK, S.; FITZGERALD, A. P.; O'TOOLE, P. W.; STANTON, C.; ROSS, P. Alterations in intestinal microbiota of elderly Irish subjects post-antibiotic therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 68, p. 214-221, 2013.

OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 298, p. 807-819, 2010.

PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A.; BROWN, P. O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **Plos Biology**. v. 5, n. 7, p. 1556-1573, 2007.

PAOLILLO, R.; CARRATELLI, C. R.; SORRENTINO, S.; MAZZOLA, N.; RIZZO, A. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. **International Immunopharmacology**. v. 9, p. 1265-1271, 2009.

PEI, A.; NOSSA, C. W.; CHOKS, P.; BLASER, M. J.; YANG, L.; ROSMARIN, D. M.; PEI, Z. Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. **Plos One**. v. 4, i. 5, 2009.

PEIXOTO, B. M. **Classificação de sequências e análise de diversidade em metagenômica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DEN BRANDT, P. A.; STOBBERINGH, E. E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**. v. 118, n. 2, 2006.

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M. E. V.; HENRIKSNAS, J.; PETERSSON, P.; GENDLER, S. J.; SANDLER, S.; PERSSON, E. G.; HANSSON, G. C.; HOLM, L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 295, p. 806-812, 2008.

POP, M.; SALZBERG, S. L. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. **Trends in Genetics**. v. 24, n. 3, p. 142-149, 2008.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J. M.; HANSEN, T.; PASLIER, D. L.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER,

K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORE, J.; GUARNER, F.; KRISTIENSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J. METAHIT CONSORTIUM; BORK, P.; EHRLICH, S. D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**. v. 464, n. 4, p. 59-67, 2010.

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

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

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**. v. 43, p. 1-7, 2010.

RIESENFELD; C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**. v. 38, p. 525–52, 2004.

ROTHBERG, J. M.; HINZ, W.; REARICK, T. M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J. H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M. J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J. F.; MARRAN, D.; MYERS, J. W.; DAVIDSON, J. F.; BRANTING, A.; NOBILE, J. R.; PUC, B. P.; LIGHT, D.; CLARK, T. A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J. T.; STONER, I. B.; CAWLEY, S. E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOVA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARY, M.; DIMALANTA, E.; DRESSMAN, D.; KASINSKAS, R.; SOKOLSKY, T.; FIDANZA, J. A.; NAMSARAEV, E.; MCKERNAN, K. J.; WILLIAMS, A.; ROTH, G. T.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**. v. 475, p. 348-352, 2011.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**. v. 9, p. 313-323, 2009.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, p. 107–110, 1999.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAVAGE, D. C. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. **Annual Review of Microbiology**. v. 31, p. 107-133, 1977.

SCHLOISSNIG, S.; ARUMUGAM, M.; SUNAGAWA, S.; MITREVA, M.; TAP, J.; ZHU A.; WALLER, A.; MENDE, D. R.; KULTIMA, J. R.; MARTIN, J.; KOTA, K.; SUNYAEV, S. R.; WEINSTOCK, G. M.; BORK, P. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. **Nature**. v. 493, p. 45-50, 2013.

SCHWARTZ, S.; FRIEDBERG, I.; IVANOV, I. V.; DAVIDSON, L. A.; GOLDSBY, J. S.; DAHL, D. B.; HERMAN, D.; WANG, M.; DONOVAN, S. M.; CHAPKIN, R. S. A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response. **Genome Biology**. v. 13, n. 32, 2012.

SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; SCHÄFER, K.; BEIJER, S.; BOS, N. A.; DONUS, C.; HARDT, P. D. Microbiota and SCFa in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**. v. 18, n. 1, p. 190-195, 2009.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**. v. 90, p. 859-904, 2010.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International of Dairy Journal**. v. 17, p. 1262-1277, 2007.

SIMRÉN, M.; BARBARA, G.; FLINT, H. J.; SPIEGEL, B. R.; SPILLER, R. C.; VANNER, S.; VERDU, E. F.; WHORWELL, P. J.; ZOETENDAL, E. G. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. **Gut**. v. 62, p. 159-176, 2013.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. S.; SPIER, M. R.; MEDEIROS, A. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. The potential of probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**. v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

TANNOCK, G. W.; MUNRO, K.; HARMSSEN, H. J. M.; WELLING, G.; SMART, J.; GOPAL, P. K. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 6, p. 2578-2588, 2000.

TANNOCK, G. W. New perceptions of the gut microbiota: implications for future research. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 34, p. 361-382, 2005.

THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**. v. 486, p. 207-214, 2012.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. **Ageing Research Reviews**. v. 9, p. 107-116, 2010.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDI, E. R.; GORDON, J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**. v. 444, n. 21/28, p. 1027-1031, 2006.

TURNBAUGH, P. J.; BÄCKHED, F.; FULTON, L.; GORDON, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell Host Microbe**. v. 3, n. 4, p. 213-223, 2008.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. B.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH, A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**. v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009a.

TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translation Medicine**. v. 1, n. 6, 2009b.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**. v. 18, p. 714-728, 2008.

VRIEZE, A.; NOOD, E. V.; HOLLEMAN, F.; SALOJÄRVI, J.; KOOTTE, R. S.; BARTELSMAN, J. F. W.; DALLINGA-THIE, G. M.; ACKERMANS, M. T.; SERLIE, M. J.; OOZEER, R.; DERRIEN, M.; DRUESNE, A.; Vlieg, J. E. T.; BLOKS, V. W.; GROEN, A. K.; HEILIG, H. G.; ZOETENDAL, E. G.; STROES, E. S.; DE VOS, W. M.; HOEKSTRA, J. B. L.; NIEUWDORP, M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. **Gastroenterology**. v. 143, p. 913-916, 2012.

WANG, Z.; KLIPFELL, E.; BENNETT, B. J.; KOETH, R.; LEVISON, B. S.; DUGAR, B.; FELDSTEIN, A. E.; BRITT, E. B.; FU, X.; CHUNG, Y.; WU, Y.; SCHAUER, P.; SMITH, J. D.; ALLAYEE, H.; TANG, W.; DIDONATO, J. A.; LUSIS, A. J.; HAZEN, S. L. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. **Nature**. v. 472, n. 7341, p. 57-63, 2011.

WANG, L.; ZHANG, J.; GUO, Z.; KWOK, L.; MA, C.; ZHANG, W.; LV, Q.; HUANG, W.; ZHANG, H. The impact of oral consumption of the probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 on the faecal microbiota, SIgA, SCFAs and TBAs of subjects of different age. **Nutrition**. 2014.

WAUGH, A. G.; FOSHAUG, R.; MACFARLANE, S.; DOYLE, J. G.; CHURCHILL, T. A.; SYDORA, B. C.; FEDORAK, R. N. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v treatment in an animal model of irritable bowel syndrome. **Microbial Ecology in Health and Disease**. v. 21, p. 33-37, 2009.

WHITELEY, A. S.; JENKINS, S.; WAITE, I.; KRESOJE, N.; PAYNE, H.; MULLAN, B.; ALLCOCK, R.; O'DONNELL, A. Microbial 16S rRNA Ion tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) platform. **Journal of Microbiological Methods**. v. 91, p. 80-88, 2012.

WILLING, B. P.; DICKSVED, J.; HALFVARSON, J.; ANDERSSON, A. F.; LUCIO, M.; ZHENG, Z.; JARNEROT, G.; TYSK, C.; JANSSON, J. K.; ENGSTRAND, L. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. **Gastroenterology**. v. 139, p. 1844-1854, 2010.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary Kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WOOLEY, J.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A primer on metagenomics. **Plos Computational Biology**. v. 6, n. 2, e1000667, 2010.

WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y.; KEILBAUGH, S. A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; SINHA, R.; GILROY, E.;

GUPTA, K.; BALDASSANO, R.; NESSEL, L.; LI, H.; BUSHMAN, F. D.; LEWIS, J. D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**. v. 334, n. 6052, p. 105-108, 2011.

YATSUNENKO, T.; REY, F. E.; MANARY, M. J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; BALDASSANO, R. N.; ANOKHIN, A. P.; HEATH, A. C.; WARNER, B.; REEDER, J.; KUCZYNSKI, J.; CAPORASO, G.; LOZUPONE, C. A.; LAUBER, C.; CLEMENTE, J. C.; KNIGHTS, D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**. v. 486, p. 222-228, 2012.

YEN, D.; CHEUNG, J.; SCHEERENS, H.; POULET, F.; MCCLANAHAN, T.; MCKENZIE, B.; KLEINSCHEK, M.A.; OWYANG, A.; MATTSON, J.; BLUMENSCHNEIN, W.; MURPHY, E.; SATHE, M.; CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A.; RENNICK, D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, p. 1310-1316, 2006.

YERGEAU, E.; LAWRENCE, J. R.; SANSCHAGRIN, S.; WAISER, M. J.; KORBER, D. R.; GREER, C. W. Next-generation sequencing of microbial communities in the Athabasca River and its tributaries in relation to oil sands mining activities. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 21, p. 7626-7637, 2012.

ZOETENDAL, E. G.; WRIGHT, A. V.; VILPPONEN-SALMELA, T.; BEN-AMOR, K.; AKKERMANS, A. L.; DE VOS, W. M. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n 7, p. 3401-3407, 2002.

ZOETENDAL, E. G.; COLLIER, C. T.; KOIKE, S.; GASKINS, H. R.; MACKIE, R. I.; GASKINS, H. R. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. **The Journal of Nutrition**. v. 134, p. 465-472, 2004.

ZOETENDAL, E. G.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; DE VOS, W. M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**. v. 57, n. 11, p. 1605- 1615, 2008.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS INICIAIS**

---

## 1 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E SUJEITOS DA PESQUISA PRELIMINAR

O estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa envolveu 61 (sessenta e um) voluntários adultos saudáveis de ambos os sexos. Não foram inseridas nenhuma modificação ou restrição na dieta dos indivíduos, apenas a introdução de uma dose diária de um leite fermentado contendo *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* Lp-115 e orientado para a não utilização de antibióticos durante a vigência da pesquisa ou a comunicação do uso aos coordenadores do projeto.

Os 61 indivíduos adultos saudáveis (escolhidos aleatoriamente), com idade superior a dezoito anos, consumiram durante três meses do ano de 2009, dose diária de 80mL de produto probiótico com quantidade do microrganismo não inferior a  $1 \times 10^8$  UFC/dose, sendo que a cada 15 dias um grupo de 10 indivíduos deixou de receber o produto probiótico.

Dessa forma, Costa e colaboradores (2014) avaliaram a ocorrência e permanência do *L. plantarum* na microbiota fecal desses indivíduos durante o consumo e pós consumo do produto.

Cada voluntário forneceu uma amostra fecal anteriormente ao início da terapia probiótica (dia 0). Em acréscimo, outras amostras fecais foram fornecidas durante a terapia nos tempos previamente estabelecidos (dias 15, 30 e 90). Por fim, os voluntários forneceram mais duas amostras fecais após a interrupção da terapia com probiótico (+15 e + 45 dias, ou seja, 15 e 45 dias após a interrupção da terapia).

Foram selecionados apenas três períodos da amostragem para a continuidade da pesquisa, os quais constituem o presente estudo. A designação ao longo do trabalho será 'T0' para o tempo 0 (antes da terapia probiótica), 'T90' para o 90° dia de terapia (durante o consumo) e 'T+15' para o período de 15 dias após a interrupção da terapia (pós consumo).

### 1.2 MATERIAL

Antes, durante e após a terapia probiótica realizada no estudo preliminar, os voluntários forneceram amostras fecais de aproximadamente 5 g em frascos esterilizados, os quais foram resfriados e conduzidos ao laboratório. Cada amostra foi homogeneizada,

fracionada em triplicatas em frascos *Eppendorfs* (2 mL) e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram mantidas a essa temperatura até o momento da extração do DNA do presente estudo.

### 1.3 MÉTODOS

#### 1.3.1 Extração de DNA das Amostras Fecais

Foram selecionadas amostras fecais de 20 (vinte) indivíduos que ingeriram o leite fermentado por *L. plantarum* durante 90 dias. Para extração do DNA fecal foi utilizada uma amostra de 200 mg a partir do material de cada indivíduo em cada um dos períodos determinados (T0, T90 e T+15), totalizando 60 amostras. A extração do DNA bacteriano das amostras fecais foi realizada utilizando o mini *kit* comercial QIAamp® DNA Stool (Qiagen), conforme instruções do fabricante. O DNA foi diluído em 200  $\mu\text{L}$  de Tampão AE (Qiagen) e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### 1.3.2 Amplificação do Gene 16S rRNA

A presença do gene 16S rRNA nas 60 amostras de DNA extraídas do material fecal foi analisada por meio da técnica de PCR utilizando iniciadores universais (5'-3') - fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG e rD1: AAGGAGGTGATCCAGCC - descritos por Weisburg e colaboradores (1991). Estes oligonucleotídeos iniciadores específicos para a extensão total do gene 16S rRNA amplificam um fragmento de aproximadamente 1540 pb.

Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de 20  $\mu\text{L}$  contendo 2,0  $\mu\text{L}$  do DNA genômico das amostras fecais, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão para reação (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de KCl), 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM dNTP (Invitrogen), 5 pmol de cada iniciador e água Milli-Q esterilizada.

A reação de amplificação foi realizada em aparelho termociclador (TC-412 Thermal Cycler (Techne Endurance), com uma etapa de desnaturação inicial  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 min., seguido de 35 ciclos compostos de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 min., pareamento a  $58^{\circ}\text{C}$  por 1min. e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 min. Ao final, foi adicionado um passo extra de extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

Após a reação foi adicionado a cada amostra 2  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida (0,25 g de azul de bromofenol, 15 g de Ficoll 400 em 100 mL de água ultra pura autoclavada) e 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi avaliada por eletroforese em 80 mL de gel de agarose a 1% (p/v) em tampão SB (89 mM ácido bórico, 89 mM Tris e 2.5 mM EDTA, pH 8.3), corado com 4.6  $\mu\text{L}$  de Sybr Safe (Invitrogen). Como referências, foi utilizado um marcador molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A eletroforese foi conduzida a 3 V/Cm e o gel visualizado foi fotografado em aparelho fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia).

Com base na análise comparativa dos resultados dessa primeira amplificação por PCR, foram selecionados dez indivíduos nos três períodos previamente descritos para a continuidade da investigação.

### 1.3.3 Amplificação da Região Variável V4 do Gene 16S rRNA e Purificação do Produto de PCR

Para detecção do maior número de unidades taxonômicas possíveis (principalmente espécies), foram utilizados os iniciadores universais degenerados (5'-3') - f515: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA e r806: GGACTACHVGGGTWTCTAAT - descritos por Bates e colaboradores (2011b). Estes oligonucleotídeos iniciadores são específicos para a quarta região variável do gene 16S rRNA correspondente aos nucleotídeos 533 – 786 na linhagem referência *Escherichia coli* 83972 (CAPORASO et al., 2011a), dessa forma, amplificam um fragmento de aproximadamente 253 pb.

Para cada reação de amplificação (30 amostras) foi preparado um volume total de 20  $\mu\text{L}$  contendo os mesmos reagentes citados no tópico anterior. A amplificação de DNA foi realizada em aparelho termociclador TC-412 Thermal Cycler (Techne Endurance), com uma etapa de desnaturação inicial 95°C por 3 min., seguido de 40 ciclos compostos de desnaturação a 95°C por 45 seg., pareamento a 50°C por 1min. e extensão a 72°C por 1 min. Ao final, foi adicionado um passo extra de extensão a 72°C por 10 min. e as condições da eletroforese já descritas.

Obtidos os produtos de PCR (*amplicons*), procedeu-se uma purificação utilizando-se o *kit* para purificação de produto de PCR innuPREP DOUBLEpure (AnalytikJena), conforme as instruções do fabricante. De acordo com a visualização das amplificações, dois indivíduos e

seus respectivos períodos de avaliação (seis amostras) foram selecionados para o sequenciamento e análise da microbiota fecal.

#### 1.3.4 Sequenciamento de DNA das Amostras Fecais

Os produtos de PCR purificados foram quantificados por fluorimetria e o sequenciamento propriamente dito foi realizado no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) de Londrina, pelo Dr. Juscélio Donizete Cardoso, sob a supervisão da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Diva S. Andrade (coordenadora do laboratório de Microbiologia do solo),

O sequenciamento das seis amostras foi realizado em um sequenciador Ion Torrent (Life Technologies) com um Ion Chip 316 (Life Technologies). Geralmente faz-se necessária a fragmentação das amostras por sonicação, no entanto, nossos produtos de PCR de 250pb eram adequados ao *kit* Ion PGM™ Template OT2 400 (Life Technologies) que permite o sequenciamento de fragmentos de aproximadamente 400 pb.

Os *amplicons* obtidos de cada amostra foram então utilizados para a construção da biblioteca, seguindo a metodologia descrita no manual do *kit* Ion Xpress™ Fragment Library (Life Technologies). Os principais passos envolveram etapas preliminares de preparo da amostra, sendo eles: I) Reparo das pontas coesivas; II) Purificação; III) Ligação dos adaptadores e barcode; IV) Amplificação da biblioteca e; V) Enriquecimento. Para a PCR em emulsão e o enriquecimento das amostras utilizou-se o manual do *kit* Ion Xpress™ Template v2.0 (Life Technologies). Já para o sequenciamento seguiu-se as instruções do manual Ion Sequencing Kit User Guide v2.0 (Life Technologies).

#### 1.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas pela plataforma Ion Torrent foram carregadas no servidor MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>), limitando-se o acesso exclusivamente aos participantes do projeto. Esse servidor de análises metagenômicas filtra as leituras de baixa qualidade baseado no comprimento destas e número de bases ambíguas e, posteriormente, identifica por alinhamento sequências em diferentes bancos de dados.

A anotação foi realizada por comparação em termos taxonômicos, principalmente para coleta de informações relativas à abundância dos microrganismos identificados. Nosso grupo

de pesquisa adotou os seguintes parâmetros para a análise das sequências: valor de corte (*E-value*) de  $10^{-5}$ , corte de identidade 95% e o banco de dados de sequências ribossomais RDP (disponibilizado a partir do servidor MG-RAST). Os dados em formato *.tsv* foram utilizados como arquivo de entrada do Microsoft Excel 2010 para criação dos gráficos.

O servidor MG-RAST também calculou automaticamente a diversidade alfa de cada amostra, para sintetizar a distribuição de anotações ao nível de espécies e demonstrar a variabilidade local. Esse indicador resume a diversidade de microrganismos de uma amostra com um único valor. A seguinte fórmula foi utilizada pelo programa:

$$\alpha = \exp(H) = \exp\left(-\sum_{i=1}^m p_i \ln(p_i)\right)$$

Onde  $p$  é a proporção do número de anotações de cada espécie com o número total de anotações e  $m$  é o número total de diferentes espécies anotadas.  $H$  representa o índice de diversidade de *Shannon*.

Importante ressaltar que o sequenciamento de DNA no Ion Torrent apresenta, embora aleatório, rendimentos desiguais na geração de sequências para cada amostra. Para correção das diferenças numéricas, e análise comparativa do microrganismo alvo nos três períodos de avaliação, nos baseamos na seguinte fórmula estatística para obtenção de uma proporção amostral ( $\hat{p}$ ):

$$\hat{p} = \frac{X}{n} = \frac{(\text{número de elementos da amostra que apresentam a característica})}{(\text{tamanho da amostra})}$$

No presente estudo os parâmetros foram adequados:

$$\hat{p} = \frac{X}{n} = \frac{(\text{número de sequências identifica das como } L. \text{ plantarum})}{(\text{número total de sequências de rRNA identifica das})}$$

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 2.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RNA RIBOSSOMAL

O DNA total das amostras fecais de 20 indivíduos (60 amostras) foi amplificado por PCR com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para genomas bacterianos. Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose 1% para confirmação da presença bacteriana (Fig. 1). Com base na análise comparativa dos resultados da amplificação, foram selecionados dez indivíduos para a continuidade da investigação.

**Figura 1.** Eletroforese do produto de PCR com aproximadamente 1500 pb em gel de agarose 0,8%, obtido a partir da amplificação do gene 16S rRNA de amostras fecais de quatro indivíduos nos três períodos de avaliação. MM: Marcador de tamanho Molecular (1Kb), + : controle positivo, - : controle negativo, nomenclaturas dos indivíduos.



### 2.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO VARIÁVEL DO GENE 16S RNA RIBOSSOMAL

A “região hipervariável” do gene 16S rRNA adotada, demonstra mais facilmente a diversidade de sequências entre diferentes espécies bacterianas, auxiliando a identificação taxonômica. Em particular, a sequência da região variável V4, com tamanho médio de 250 pb de extensão, é compatível com o sequenciamento na plataforma Ion Torrent sem a necessidade de fragmentação e bastante utilizada em estudos de diversidade ou avaliação da

microbiota fecal humana (LARSEN et al., 2010; CAPORASO et al., 2011b; CLAEISSON et al., 2011; YATSUNENKO et al., 2012; DAVID et al., 2014; O’SULLIVAN et al., 2013) e outros ecossistemas complexos (BATES et al., 2011a; CAPORASO et al., 2011a; BOKULICH et al., 2012).

Apesar do curto comprimento das leituras geradas, essa região alvo pode fornecer resolução suficiente para a exata classificação taxonômica da maioria dos indivíduos (LIU et al., 2007). Bokulich e colaboradores (2012) compararam as regiões V4 e V5 do rRNA em uma investigação relacionada à comunidade bacteriana de vinhos e determinação da região mais informativa em termos de gêneros. Os autores observaram que o “domínio” V4 apresentou a leitura mais adequada para estudos de ecologia de comunidades microbianas associadas a vinhos, visto que forneceu maior resolução taxonômica no perfil das BAL.

Claesson e colaboradores (2009) analisaram mais de 7.000 sequências referências completas do gene 16S rRNA obtidas de amostras fecais humanas (DETHLEFSEN et al., 2008) e também relataram a capacidade da fração V4 apresentar o maior número de sequências corretamente classificadas quando comparada a V3 e V6.

Desse modo, selecionamos essa região por sua documentada robustez na classificação, além de ser a mais descrita na literatura. Adicionalmente, os iniciadores f515/r806, utilizados nesse trabalho, foram selecionados para serem “universais” amplificando quase a totalidade de bactérias e arqueas. Bates e colaboradores (2011b) demonstraram *in silico* que esse par de iniciadores amplifica uma ampla variedade de grupos bacterianos e arqueas com poucos vieses ou táxons excluídos.

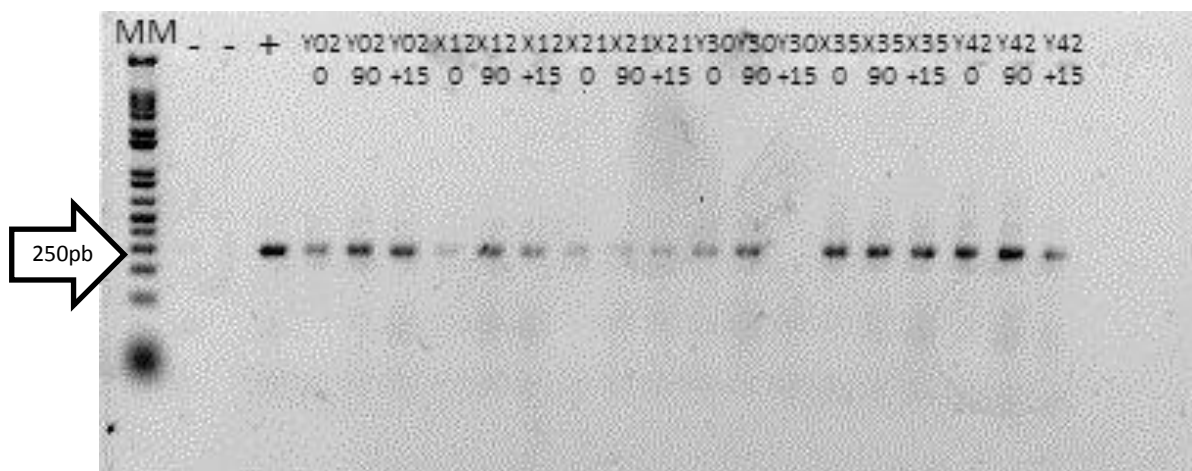
O DNA das amostras fecais de dez indivíduos nos três períodos de avaliação foi então amplificado por PCR com a utilização dos iniciadores descritos (Fig. 2) e para a maioria das amostras, a amplificação por PCR da região V4 foi observada.

### 2.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA DAS AMOSTRAS FECAIS

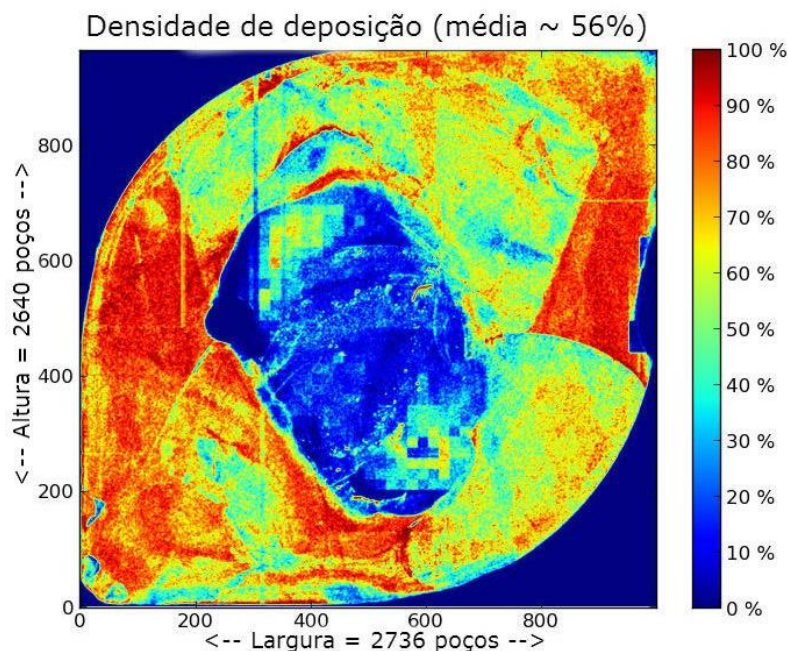
A análise da microbiota fecal de dois dos indivíduos selecionados foi realizada na plataforma Ion Torrent com a utilização do Ion Chip 316, condição que permite a geração de aproximadamente 100 Mb de sequências. Nesse experimento foram obtidos 56% de deposição de *Ion Spheres Particles* (ISP) no chip (Fig. 3), onde 91% destas continham fragmentos de DNA. Foram obtidas 37% de esferas policlonais na PCR de emulsão, e 28%

com fragmentos de baixa qualidade. Após a filtragem das sequências de baixa qualidade e que apresentavam policlonalidade (processo realizado pelo pacote computacional associado ao próprio sequenciador), foram geradas 1.455.256 leituras (*reads*) a partir das seis amostras avaliadas (Fig. 4).

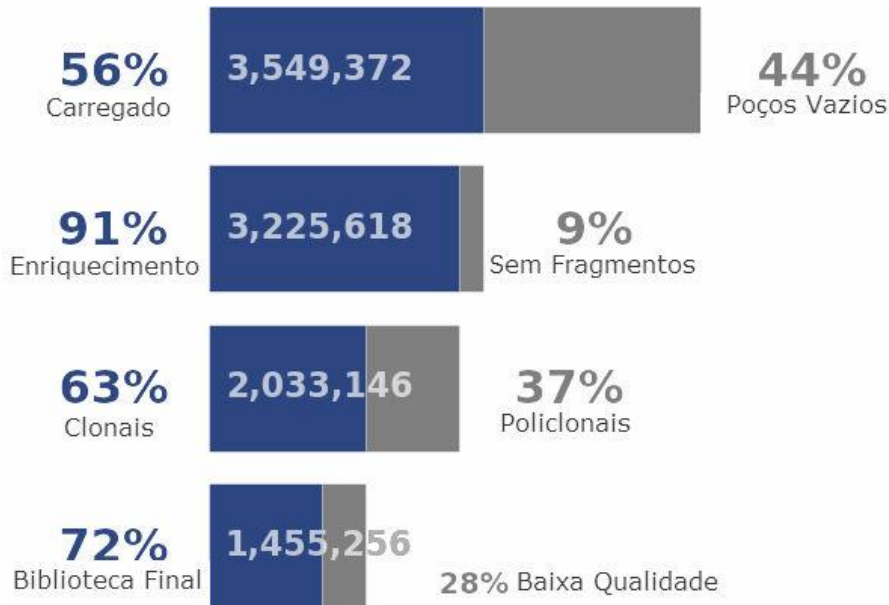
**Figura 2.** Eletroforese do produto de PCR com aproximadamente 250 pb em gel de agarose 0,8%, obtido a partir da amplificação da região variável do gene 16S rRNA de amostras fecais de seis indivíduos nos três períodos de avaliação. MM: Marcador de tamanho Molecular (1Kb), + : controle positivo, - : controle negativo, nomenclaturas dos indivíduos.



Densidade de deposição das *Ion Spheres Particles* no chip de sequenciamento. A porcentagem de deposição em cada região do chip está representada por uma escala de cor onde as regiões em laranja e vermelho apresentam alta densidade.



**Figura 4.** Perfil geral do carregamento do chip e sequenciamento no Ion Torrent. \*Número total de sequências obtidas após filtragens para eliminar sequências de baixa qualidade e sequências policlonais.



O número de sequências geradas no experimento diferiu consideravelmente entre as seis amostras (Tabela 1), onde verificamos uma super-representação referente a amostra ‘X35 T+15’ em contraposição a amostra ‘X35 T0’ que foi menos representada. O servidor MG-RAST filtrou novamente as sequências de baixa qualidade e produziu um total de sequências identificadas como RNA ribossomal, a medida que estas foram alinhadas contra os diferentes bancos de dados utilizados pelo programa (SSU - Silva rRNA Database Project, M5RNA - NCBI GenBank e outros , RDP e 16S rRNA Greengenes Database).

Número de bases e leituras geradas na corrida de sequenciamento para cada amostra. A última coluna apresenta as sequências identificadas pelo MG-RAST como RNA ribossomal.

Nomenclatura no sequenciador	Amostra	Bases	Leituras	Comprimento médio da leitura	Sequências alinhadas pelo MG-RAST
IonXpress_001	Y02 T0	22.907.554	145.147	157 pb	71.414
IonXpress_002	Y02 T90	21.422.388	133.145	160 pb	67.565
IonXpress_003	Y02 T+15	40.089.471	248.651	161 pb	131.569
IonXpress_004	X35 T0	17.708.067	111.661	158 pb	50.141
IonXpress_005	X35 T90	34.872.601	224.953	155 pb	97.261
IonXpress_006	X35 T+15	83.541.391	546.038	152 pb	228.373

## REFERÊNCIAS

- BATES, S. T.; CROUSEY, G. W. G.; CAPORASO, G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Bacterial Communities Associated with the Lichen Symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n. 4, p. 1309-1314, 2011a.
- BATES, S. T.; BERG-LYONS, D.; CAPORASO, J. G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**. v. 5, p. 908-917, 2011b.
- BOKULICH, N. A.; JOSEPH, C. M. L.; ALLEN, G.; BENSON, A. K.; MILLS, D. A. Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. **Plos One**. v. 7, i. 5, e36357, 2012.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; NOAH FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 108, p. 4516-4522, 2011a.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; COSTELLO, E. K.; BERG-LYONS, D.; GONZALEZ, A.; STOMBAUGH, J.; KNIGHTS, D.; GAJER, P.; RAVEL, J.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Moving pictures of the human microbiome. **Genome Biology**. v. 12, n. 50, p. 1-8, 2011b.
- CLAESSON, M. J.; O'SULLIVAN, O.; WANG, Q.; NIKKILÄ, J.; MARCHESI, J. R.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. L. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. **Plos One**. v. 4, i. 8, e6669, 2009.
- CLAESSON, M. J.; CUSACK, S.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; WEERD, H.; FLANNERY, E.; MARCHESI, J. R.; FALUSH, D.; DINAN, T.; FITZGERALD, G.; STANTON, C.; SINDEREN, D.; O'CONNOR, M.; HARNEDY, N.; O'CONNOR, K.; HENRY, C.; O'MAHONY, D.; FITZGERALD, A. P.; SHANAHAN, F.; TWOMEY, C.; HILL, C.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W. Composition, variability and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 108, p. 4586-4591, 2011.
- COSTA, G. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; VILAS-BÔAS, G. T.; MATSUO, T.; MIGLIORANZA, L. H. S. Potential fate of ingested *Lactobacillus plantarum* and its occurrence in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 80, n. 3, p. 1013-1019, 2014.
- DAVID, L. A.; MAURICE, C. F.; CARMODY, R. N.; GOOTENBERG, D. B.; BUTTON, J. E.; WOLFE, B. E.; LING, A. V.; DEVLIN, A. S.; VARMA, Y.; FISCHBACH, M. A.; BIDDINGER, S. B.; DUTTON, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**. v. 505, p. 559-563, 2014.
- DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**. v. 449, p. 811-818, 2007.

LARSEN, N.; VOGENSEN, F. K.; VAN DEN BERG, F. W. J.; NIELSEN, D. S.; ANDREASEN, A. S.; PEDERSEN, B. K.; AL-SOUD, W. A.; SØRENSEN, S. J.; HANSEN, L. H.; JAKOBSEN, M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **Plos One**. v. 5, i. 2, e9085, 2010.

LIU, Z.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F. D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic Acids Research**. v. 35, n. 18, 2007.

O'SULLIVAN, O.; COAKLEY, M.; LAKSHMINARAYANAN, B.; CLAESSION, M. J.; STANTON, C.; O'TOOLE P. W.; ROSS, R. P. Correlation of rRNA gene amplicon pyrosequencing and bacterial culture for microbial compositional analysis of faecal samples from elderly irish subjects. **Journal of Applied Microbiology**. v. 111, n. 2, p. 467-473, 2011.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

YATSUNENKO, T.; REY, F. E.; MANARY, M. J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; BALDASSANO, R. N.; ANOKHIN, A. P.; HEATH, A. C.; WARNER, B.; REEDER, J.; KUCZYNSKI, J.; CAPORASO, G.; LOZUPONE, C. A.; LAUBER, C.; CLEMENTE, J. C.; KNIGHTS, D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**. v. 486, p. 222-228, 2012.

## **CAPÍTULO 3**

---

# **CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL HUMANA POR ESTRATÉGIA METAGENÔMICA**

---

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos metagenômicos baseados no sequenciamento parcial do gene 16S RNA ribossomal tem revolucionado a definição dos constituintes da comunidade microbiana do intestino. Visto que o TGI humano possui um ecossistema bacteriano extremamente denso, diverso e dinâmico, uma nova era da ecologia desse ambiente foi iniciada quando o sequenciamento do RNA ribossomal foi introduzido na descrição de bactérias que não são culturáveis.

Nesse cenário, tem sido revelado que em adultos, os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* geralmente dominam a microbiota fecal, enquanto *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e outros, representam pequenas porcentagens (ECKBURG et al., 2005). Arqueas metanogênicas (principalmente *Methanobrevibacter smithii*), eucariotos (principalmente leveduras) e vírus (principalmente fagos) também estão presentes (REYES et al., 2010).

Apesar da consistência desses componentes principais, as proporções relativas e as espécies presentes variam entre indivíduos saudáveis (MARTÍNEZ; MULLER; WALTER, 2013; SCHLOISSNIG et al., 2013). Estimativas do número de espécies bacterianas presentes no TGI humano diferem entre os estudos, no entanto, tem sido reconhecido que esse ambiente abriga cerca de 1000 espécies bacterianas (ECKBURG et al., 2005; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; SMIDT; DE VOS, 2007; QIN et al., 2010; SEKIROV et al., 2010). No entanto, apenas 200 (em média) são dominantes em cada indivíduo (QIN et al., 2010).

Definitivamente, quantificar a abundância de espécies não é sempre possível ou confiável, pois diversos fatores como o tamanho do genoma, similaridades no genoma e o conjunto de referências) influenciam os resultados (LINDNER; RENARD, 2013). Ainda assim, muitos estudos têm tentado descrever a microbiota intestinal normal em termos de espécies e gêneros microbianos que habitam humanos saudáveis (ECKBURG et al., 2005; WANG et al., 2005; CLAEISSON et al., 2011; THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012; MARTÍNEZ; MULLER; WALTER, 2013; SCHLOISSNIG et al., 2013), porém, os fatores citados e as diferenças individuais na composição da microbiota tornam a definição desse conceito muito desafiadora.

No Brasil, a microbiota fecal humana já foi anteriormente acessada por métodos culturáveis, onde grupos específicos foram analisados. Oliveira (2011) e Brandt e

colaboradores (2012), analisaram por metagenômica a microbiota fecal de recém-nascidos saudáveis durante o primeiro ano de vida, no entanto, as 4000 sequências do gene 16S rRNA foram obtidas por clonagem.

Outros autores brasileiros descreveram a microbiota intestinal de animais por pirosequenciamento, que permite o sequenciamento massivo de materiais genéticos extraídos do TGI (CARICILLI et al., 2011, CARVALHO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Não há, contudo, uma descrição detalhada da microbiota fecal de indivíduos adultos no Brasil. Assim, o presente capítulo teve como objetivo caracterizar a microbiota fecal de dois sujeitos saudáveis residentes na cidade de Londrina, PR por meio de estratégia metagenômica, empregando o sequenciamento de íon.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

Um total de 145.147 e 111.661 leituras de sequências de alta qualidade foram geradas a partir do material fecal de dois humanos saudáveis. Nomenclatura empregada: Y02 - sexo masculino (indivíduo 1), X35 - sexo feminino (indivíduo 2).

Por “saudáveis” consideramos sujeitos adultos, sem evidência de doenças, e sem histórico de doenças gastrointestinais ou metabólicas. Os sujeitos da pesquisa não estavam sob tratamento com antibióticos durante e por pelo menos três meses anteriormente à amostragem. Para informações sobre os hábitos alimentares e atividade física dos dois voluntários, foi realizada uma anamnese (Anexo 1).

No período da amostragem, o indivíduo 1 com idade entre 25 e 30 anos e Índice de Massa Corporal (IMC) = 29,3, possuía uma dieta rica em proteína animal (carne vermelha e de aves, além de laticínios) e rica em açúcar (proveniente de refrigerantes e doces). Apesar do baixo consumo de fibra, esse indivíduo consumia mais de dois litros de água diariamente.

O indivíduo 2, com idade entre 30 e 35 anos e IMC = 18,4, possuía uma dieta rica em fibras (saladas de folhas e legumes, além de barras de cereais) e consumia em média um litro de água diariamente. Sua dieta era rica em proteína vegetal (arroz, feijão e glúten) e proteína animal (laticínios predominantemente). Ambos consumiam muito amido diariamente e não

eram fumantes, além de alegaram a prática moderada de atividades físicas, uma a duas vezes por semana.

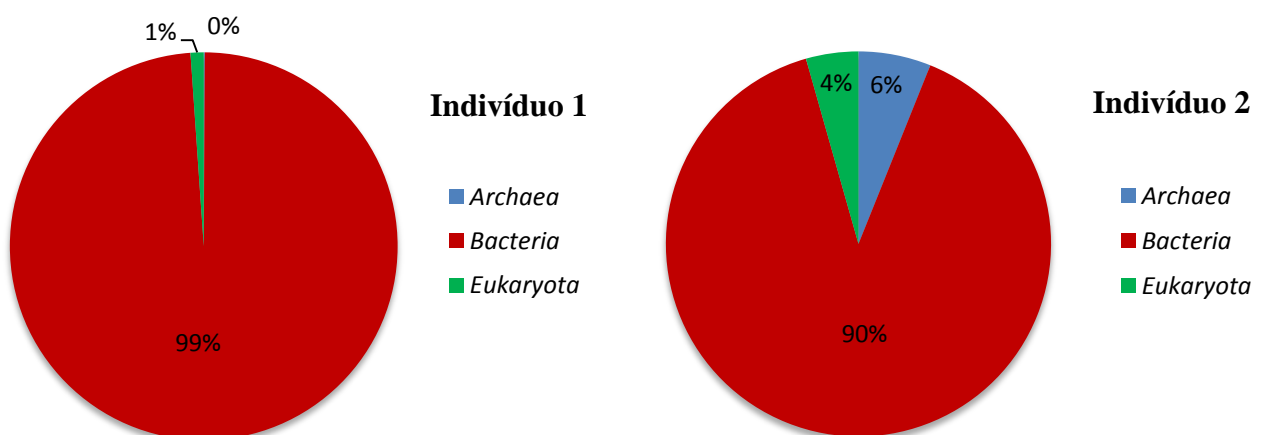
As duas amostras descritas nesse capítulo são relativas ao tempo zero (T0) da investigação probiótica executada por Costa e colaboradores (2014). Os métodos utilizados para o sequenciamento de DNA e análises dos dados foram abordados no Capítulo 2.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 PERFIL DA MICROBIOTA FECAL DOS INDIVÍDUOS

Os resultados descritos constituem o primeiro estudo metagenômico de amostras fecais de indivíduos adultos brasileiros. Durante a normalização (controle de qualidade) e processamento das sequências, o MG-RAST identificou um total de 71.414 e 50.141 sequências de RNA ribossomais, respectivamente para o indivíduo 1 e 2. Dentre essas a maioria foi anotada como pertencente ao domínio *Eubacteria* (Fig. 1).

**Figura 1.** Distribuição de domínios taxonômicos presentes na microbiota fecal dos dois indivíduos amostrados.



Como relatado na literatura, a espécie *Methanobrevibacter smithii* representou a principal *Archaea* metanogênica detectada na microbiota fecal dos indivíduos (ECKBURG et al., 2005; LEY et al., 2006; DRIDI et al., 2009). No indivíduo 2 esta espécie foi abundante

com 3566 sequências identificadas, ou seja, 6% do total de sequências de rRNA, contra apenas 79 no indivíduo 1, ou seja, 0,09% do total de sequências de rRNA anotadas.

No intestino humano, esse organismo converte hidrogênio (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ou acetato em metano, utilizando carbono como aceptor terminal de elétrons - reação de oxirredução que favorece a respiração anaeróbica e permite a produção de ATP. Além disso, essa arquea representa um membro autóctone importante, pois remove produtos finais de fermentação, como metanol e etanol, que são produzidos por outras bactérias que não possuem uma via metabólica metanogênica (SCANLAN; SHANAHAN; MARCHESI, 2008).

Em relação aos filos bacterianos presentes na microbiota fecal (Fig. 2), a análise dos dois indivíduos confirma observações anteriores realizadas em outros países: *Firmicutes* é o filo mais abundante, seguido por *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (ECKBURG et al., 2005; GILL et al., 2006; FRANK et al., 2007; ZOETENDAL; RAJILIC-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2008; TURNBAUGH et al., 2009a; ARUMUGAM et al., 2011; CLAESSION et al., 2011).

Foram detectados membros de 15 filos do domínio *Eubacteria* (94,5%) e 1 filo correspondente ao domínio *Archaea* (3%). De acordo com o esperado a maioria das sequências foram agrupadas nos filos *Firmicutes* (78%), *Bacteroidetes* (11,5%), *Actinobacteria* (5,5%) e *Proteobacteria* (1,5%).

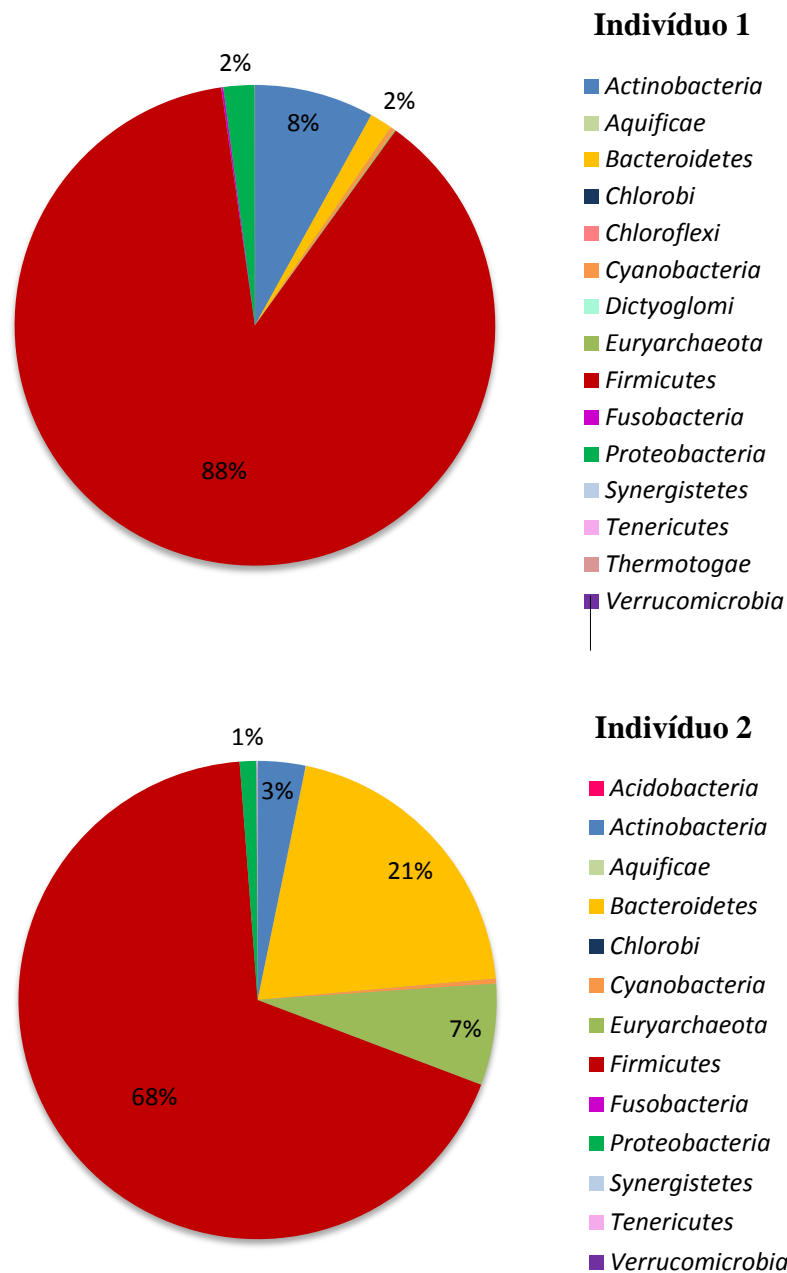
A classe *Clostridia* compôs uma porção significativa das bactérias intestinais dos indivíduos (Fig. 3), confirmando observações anteriores de que esta representa a maior divisão do filo *Firmicutes* (LOPETUSO et al., 2013). Enquanto alguns poucos membros dessa classe são patogênicos nocivos, tais como *Clostridium difficile*, *C. tetani* e *C. perfringens*, a maioria dos gêneros exerce um papel crucial na homeostase intestinal ao interagir com outras populações microbianas e desempenhar funções específicas e essenciais ao hospedeiro (LOPETUSO et al., 2013).

*C. difficile* é comumente encontrada na microbiota fecal de indivíduos saudáveis e pode representar problemas (infecções, colites pseudomembranosas e diarreias) após antibioterapia prévia e períodos prolongados de hospitalização (NOOD et al., 2013). Essa espécie foi detectada em nossos resultados com 28 sequências identificadas no indivíduo 1 contra apenas 6 no indivíduo 2 (dados não mostrados).

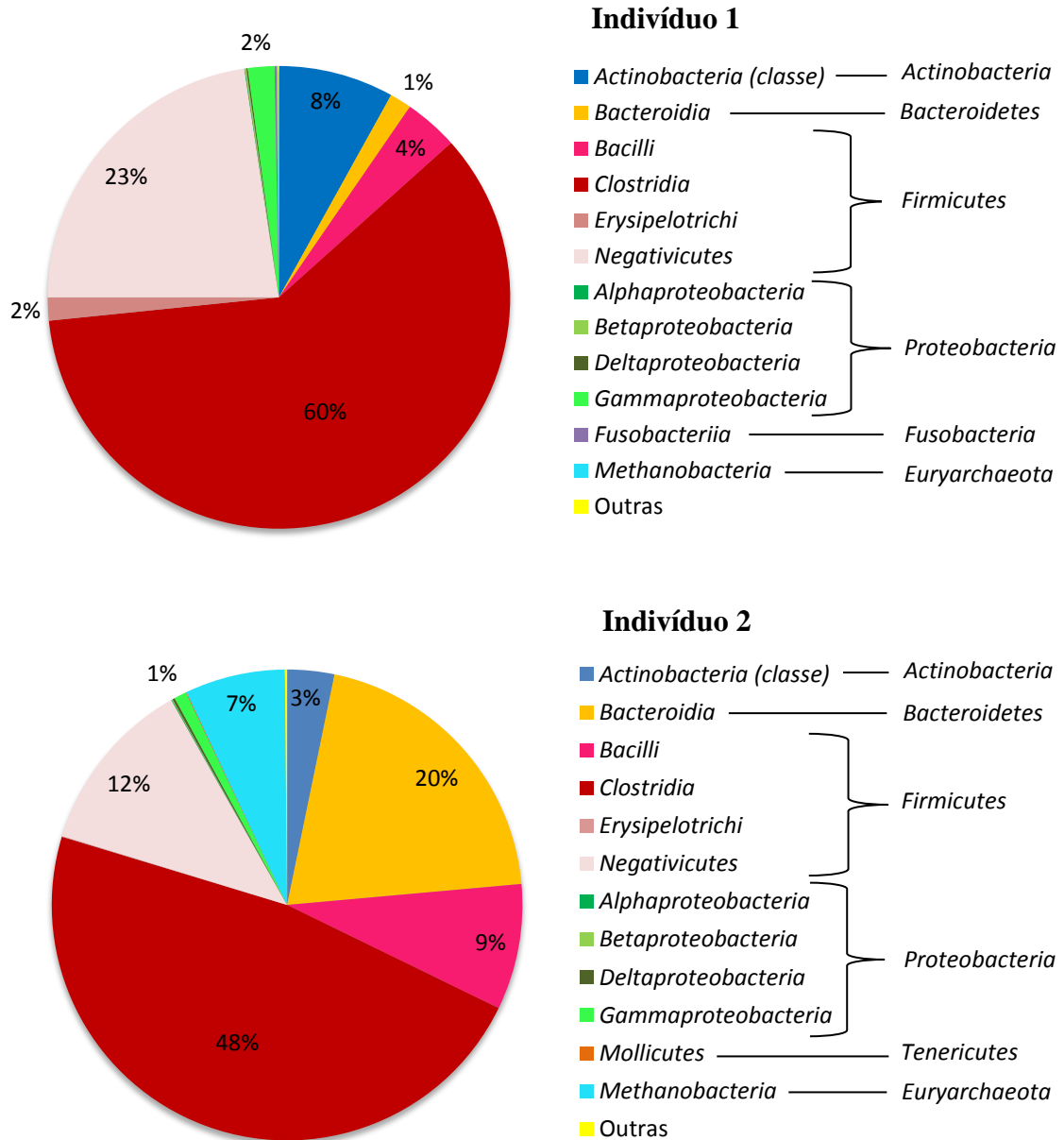
Adicionalmente, *Lachnospiraceae* foi abundante na microbiota fecal dos indivíduos. Essa família da ordem *Clostridiales* é reconhecida por ser eficiente na fermentação de fibras

alimentares e outros carboidratos complexos em butirato, um AGCC e principal metabólito do cólon, pois produz energia para os colonócitos (células do cólon), além de inibir a inflamação do cólon e carcinogênese (AHN et al., 2013).

**Figura 2.** Filos do domínio *Eubacteria* e *Archaea* encontrados na microbiota fecal dos dois indivíduos amostrados.



**Figura 3.** Principais classes (e respectivos filos) do domínio *Eubacteria* e *Archaea* encontradas na microbiota fecal dos dois indivíduos amostrados.



Os gêneros mais abundantes foram *Faecalibacterium* e *Bacteroides* (Fig. 4). Nos dois indivíduos a única espécie pertencente ao primeiro é *F. prausnitzii*, no entanto, *Bacteroides* é representado por diversas espécies principalmente *B. vulgatus*, *B. uniformis* e *B. thetaiotaomicron*.

*F. prausnitzii* tem sido relatada como a bactéria mais abundante na microbiota intestinal de adultos saudáveis (MIQUEL et al., 2013). No indivíduo 1, representa 26% da população bacteriana total, enquanto no indivíduo 2, que possui uma microbiota mais diversa, essa bactéria representa 11% da população bacteriana total. Esse microrganismo foi subestimado até recentemente quando observações de sua baixa prevalência em várias desordens intestinais (doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do intestino irritável) (SOKOL et al., 2008) sugeriram seu potencial como um indicador da saúde intestinal. Além de produzir butirato, essa espécie tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo* sendo considerada como membro essencial da microbiota ao contribuir com a homeostase no intestino (MIQUEL et al., 2013).

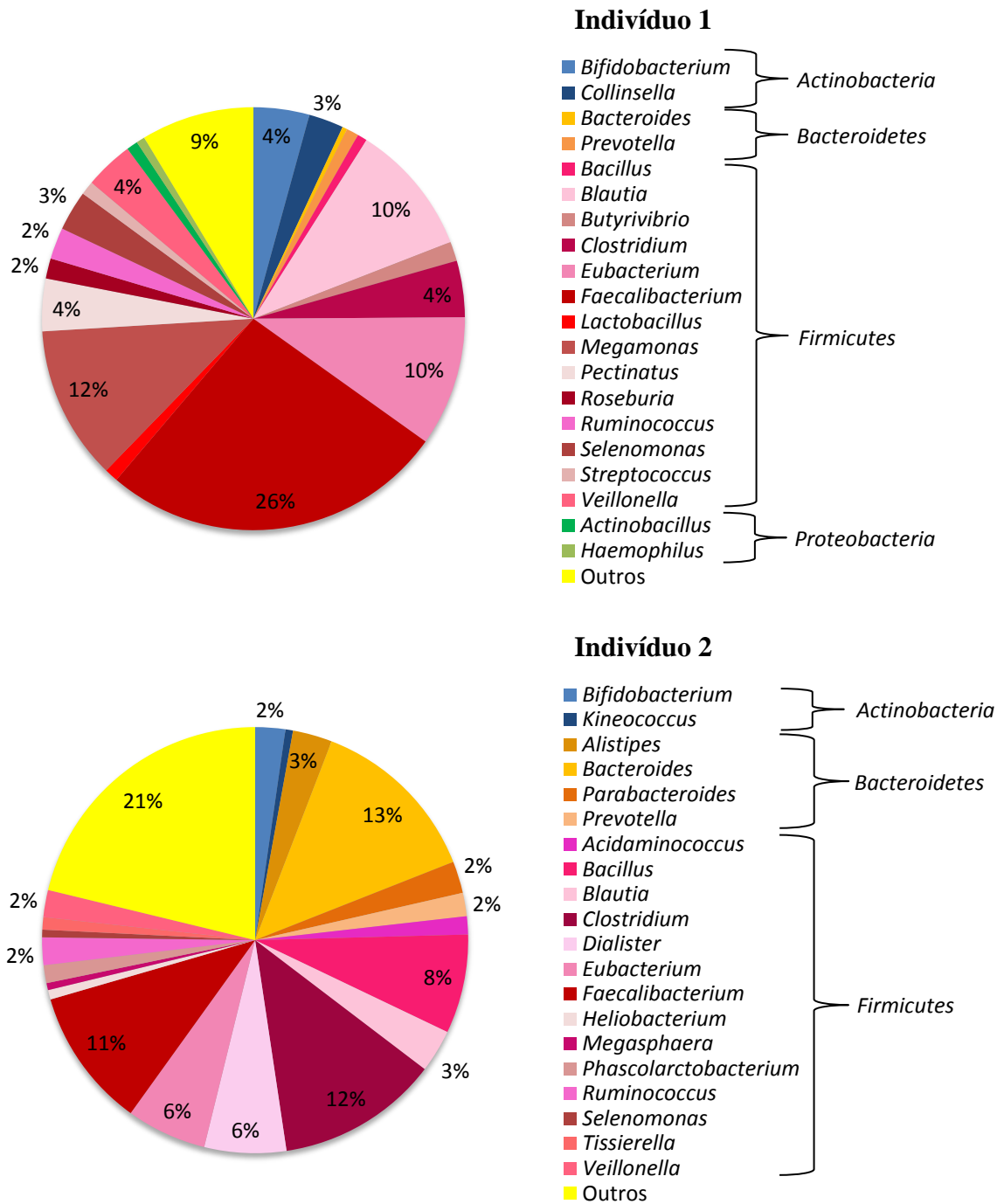
Adicionalmente, segundo Wrzosek e colaboradores (2013), *F. Prausnitzii* e *B. thetaiotaomicron* são metabolicamente complementares, modulando *in vivo* a barreira da mucosa intestinal ao modificar as células caliciformes e a glicosilação das mucinas. Dessa forma, os autores revelaram a importância do balanço dessas duas bactérias comensais na manutenção da homeostase do epitélio intestinal (do cólon) por meio dos seus efeitos sobre o muco.

Considerando os dois grandes domínios, foram identificadas aproximadamente 800 espécies pertencentes a *Eubacteria* e 4 espécies de *Archaea*. As 40 espécies dominantes variaram entre os indivíduos (Anexo 2) e foram anteriormente relatadas em estudos da microbiota fecal de humanos ou outros animais (QIN et al., 2010; CARICILLI et al., 2011; THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012; MARTÍNEZ; MULLER; WALTER, 2013; SCHLOISSNIG et al., 2013). Dentre essas, 12 espécies foram comuns nos dois sujeitos: *Bacillus subtilis*, *Blautia hansenii*, *Bifidobacterium breve*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium scindens*, *Coprococcus catus*, *Eubacterium rectale*, *F. prausnitzii*, *Lachnospiraceae bacterium A4*, *Parvimonas micra*, *Ruminococcus bromii* e *Veillonella atypica*.

Estudos apontam que alguns filotipos bacterianos (ao nível de espécies) são compartilhados por pessoas diferentes. Dessa forma, apesar do núcleo individual que representa a microbiota autóctone de humanos saudáveis, estes também dividem um núcleo comum de microrganismos no TGI. Isso confirma hipóteses de que a microbiota intestinal humana é diversa, porém dominada por um número limitado de espécies bacterianas (ZOETENDAL; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2008). Segundo Qin e colaboradores

(2010), cada indivíduo abriga cerca de 160 espécies como membros autóctones, as quais também podem ser compartilhadas com outros indivíduos.

**Figura 4.** Abundância dos 20 gêneros mais frequentes encontrados na microbiota fecal dos dois indivíduos amostrados e seus respectivos filos bacterianos.



Tentativas de encontrar um núcleo de filotipos ao nível de espécies identificaram alguns componentes principais, incluindo *F. prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* e *Bacteroides uniformis* (TURNBAUGH et al., 2009a), os quais também foram detectados em nossos resultados. Curiosamente, a proporção de *R. intestinalis* foi similar nos dois indivíduos (0,04%), enquanto *B. uniformis* foi mais abundante no indivíduo 2 (1%) quando comparado ao indivíduo 1 (0,04%). Análises posteriores com mais indivíduos poderão identificar espécies similares para verificação de um grupo dominante entre indivíduos saudáveis brasileiros.

### 3.2 DISCUSSÃO

Tal como qualquer indivíduo que seja objeto de investigação, os sujeitos analisados apresentam variáveis intrínsecas entre os fatores associados ao estabelecimento da microbiota intestinal. Além da genética, desde o nascimento, por meio de suas vias de parto e ambiente, a colonização foi iniciada e conduziu o perfil dos microrganismos que neles habitam. Entre as variáveis importantes, pode-se destacar também a dieta, cuja tendência global em direção a um padrão ocidental, com consumo elevado de carne vermelha e alimentos ricos em gordura e açúcar, deveria resultar em uma sutil homogeneização das comunidades microbianas dos dois indivíduos.

De acordo com os dados da anamnese realizada com os sujeitos, deve-se considerar que os dois são adultos (não apresentam grandes flutuações na microbiota), residem no mesmo município e não possuem histórico de doenças gastrointestinais ou metabólicas. Entretanto, a dieta do indivíduo 1 estava mais moldada ao estilo de vida ocidental quando comparada ao indivíduo 2, visto que sua dieta incluía mais carne vermelha e alimentos gordurosos. A relação F/B demonstrou-se sutilmente aumentada no indivíduo 1 (Fig. 2), como observado em outros estudos que demonstraram divergências na microbiota fecal entre diferentes dietas (DE FILIPPO et al., 2010; LOZUPONE et al., 2012). Adicionalmente, outros autores indicaram que indivíduos obesos tem um aumento de *Firmicutes* e uma diminuição de *Bacteroidetes* (LEY et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2009a; ISMAIL et al., 2011).

Uma evidência geral na microbiota fecal dos dois indivíduos é a presença de poucos filos bacterianos nesse ecossistema sobremaneira complexo. Considerando que as bactérias da microbiota intestinal vivem sob constante pressão seletiva do hospedeiro e também de outros

microrganismos (LEY; PETERSON; GORDON, 2006), o sistema é conduzido à homeostase em que poucas bactérias são abundantes e muitas delas tem uma pequena representatividade diante do montante de organismos vivendo naquele ambiente.

Dessa forma, as análises da microbiota fecal humana revelam características intrigantes. Existem mais de 50 filos bacterianos na Terra, no entanto, apenas os quatro (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*) dominam as comunidades associadas a humanos. Por outro lado, a microbiota humana contém uma superabundância de espécies e linhagens. O contraste existe entre a diversidade reduzida considerando-se os filos e a grande diversidade quando consideradas família, gênero e espécie. Por esse motivo, quando comparamos a nossa microbiota e a microbiota de ambientes naturais, como solo ou ambientes aquáticos, observamos um padrão de distribuição de filotipos completamente diferente (Fig. 4/Cap. 1).

Possivelmente, este padrão da microbiota intestinal humana é derivado da longa trajetória co-evolutiva estabelecida entre o *Homo sapiens* e suas bactérias. Acredita-se que a distribuição de microrganismos no corpo humano reflete adaptações para a vida na terra realizadas cerca de 400 milhões de anos atrás. Devido ao fato dos microrganismos geralmente se multiplicarem melhor em ambientes úmidos, adaptações a um ambiente seco delinearão a abundância, localização e fenótipos dos microrganismos e tem limitado a troca dos mesmos entre indivíduos (DETHLEFSEN; MCFALL-NGAI; RELMAN, 2007).

De acordo com The Human Microbiome Project Consortium (2012), a descrição da microbiota fecal é composta primeiramente por associações inversas relativas ao gênero *Bacteroides*, que varia de dominante em alguns sujeitos para minoria em outros que apresentam uma maior diversidade de *Firmicutes*. Isso foi claramente demonstrado nas análises de abundância de gêneros dos dois indivíduos. Enquanto o indivíduo 2 apresentou 6534 sequências relativas ao gênero *Bacteroides*, o indivíduo 1 com apenas 198 sequências (dados não mostrados) apresentou uma microbiota substancialmente composta por *Firmicutes*.

Nesse sentido, o indivíduo 2 poderia ser inserido no enterotipo 1 preestabelecido por Arumugam e colaboradores (2011), o qual é enriquecido com *Bacteroides* (Fig. 6/Cap. 1), gênero que co-ocorre, por exemplo, com *Parabacteroides*. Esses grupos, denominados enterotipos, possuem características que os diferenciam dos demais, como a super-representação em um determinado enterotipo de enzimas envolvidas na síntese de vitaminas,

em relação aos demais. Entretanto, visto que identificar enterotipos em conjunto de dados depende não somente da estrutura dos dados, mas também da sensibilidade dos métodos aplicados em identificar a “força” do agrupamento, múltiplas abordagens devem ser usadas e comparadas quando enterotipos são testados. Os dados coletados nesta investigação podem ser utilizados em futuros estudos com mais indivíduos, com enfoque na caracterização de enterotipos.

Lozupone e colaboradores (2012) descreveram que a diversidade intestinal de indivíduos ocidentais é significativamente menor do que outras populações “menos industrializadas”, o que pode ser explicado pela teoria da higiene. Apesar da diferença numérica, nossos resultados apontam uma maior diversidade no indivíduo 2 (mulher) em relação ao 1 (homem), provavelmente devido à presença de grupos dominantes na microbiota fecal desse último. Além disso, a diversidade Alfa ( $\alpha$ ) que demonstra a variabilidade local foi maior no indivíduo 2 ( $H'$ : 64,16) quando comparado ao valor do indivíduo 1 ( $H'$ : 25,33).

No estudo de Eckburg e colaboradores (2005), o sujeito com maiores níveis de diversidade bacteriana foi aquele com mais sequências anotadas de *M. Smithii*, como observado no indivíduo 2. Essa observação pode sugerir que as arqueas exercem um efeito sobre a termodinâmica e diversidade da microbiota intestinal (LEY; PETERSON; GORDON, 2006).

Finalmente, um perfil de microbiota saudável pôde ser observado nos dois indivíduos. A quantidade considerável dos gêneros *Butyrivibrio* e *Prevotella* é um indicativo da presença de uma comunidade bacteriana que utiliza xilana, xilose e carboximetilcelulose para produção de níveis elevados de AGCCs (FLINT et al., 2008), os quais desempenham uma função protetora contra inflamações intestinais. Outras bactérias produtoras de AGCCs, como espécies de *Bacteroides* (abundantes no indivíduo 2) e de *Faecalibacterium*, especialmente *F. Prausnitzii* predominante no indivíduo 1, podem geralmente indicar a importância da manutenção de uma microbiota com capacidade potencialmente anti-inflamatória (SOKOL et al., 2008).

De fato, a complexidade da microbiota e as variações intra e inter-pessoais complicam a definição do que seria a microbiota ideal para um indivíduo ou uma população. Na realidade, caso exista a composição taxonômica de uma microbiota “ideal”, esta ainda não foi definida.

No entanto, tem sido demonstrado que uma microbiota mais diversa (com maior número de diferentes espécies) é mais saudável, eficiente e estável, pois um ecossistema diversificado é geralmente mais resiliente (LOZUPONE et al., 2012). As análises indicaram uma maior diversidade alfa na microbiota do indivíduo 2, que possuía uma dieta mais rica em fibras, com menor consumo de alimentos gordurosos, comparado ao outro indivíduo.

O sequenciamento de íon demonstrou ser uma ferramenta adequada para a presente investigação, que contribui como um primeiro passo para a futura caracterização da microbiota normal de brasileiros adultos saudáveis. Cabe destacar que somente com a compreensão precisa da variabilidade intrínseca da microbiota, poderão ser avaliados os efeitos reais de probióticos sobre a microbiota fecal.

## REFERÊNCIAS

AHN, J.; SINHA, R.; PEI, Z.; DOMINIANNI, C.; WU, J.; SHI, J.; GOEDERT, J. J.; HAYES, R. B.; YANG, L. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 105, p. 1907-1911, 2013.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; FERNANDES, G. R.; TAP, J.; BRULS, T.; BATTO, J.; BERTALAN, M.; BORRUEL, N.; CASELLAS, F.; FERNANDEZ, L.; GAUTIER, L.; HANSEN, T.; HATTORI, M.; HAYASHI, T.; KLEEREBEZEM, M.; KUROKAWA, K.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; MANICHANH, C.; NIELSEN, B.; NIELSEN, T.; PONS, N.; POULAIN, J.; QIN, J.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TIMS, S.; TORRENTS, D.; UGARTE, E.; ZOETENDAL, E. G.; WANG, J.; GUARNER, F.; PEDERSEN, O.; DE VOS, W. M.; BRUNAK, S.; DORE, J. METAHIT CONSORTIUM; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, D.; BORK, P. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**. v. 473, p. 174-180, 2011.

BRANDT, K.; TADDEI, C. R.; TAKAGI, E. H.; OLIVEIRA, F. F.; DUARTE, R. T.; IRINO, I.; MARTINEZ, M. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. **Clinics (São Paulo)**. v. 67, n. 2, p. 113-123, 2012.

CARICILLI, A. M.; PICARDI, P. K.; ABREU, L. L.; UENO, M.; PRADA, P. O.; ROPELLE, E. R.; HIRABARA, S. M.; CASTOLDI, A.; VIEIRA, P.; CAMARA, N. O. S.; CURI, R.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. A. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. **Plos Biology**. v. 9, n. 12, e1001212, 2011.

CARVALHO, B. M.; GUADAGNINI, D.; TSUKUMO, D. L.; SCHENKA, A. A.; LATUFF-FILHO, P.; VASSALL, J.; DIAS, J. C.; KUBOTA, L. T.; CARVALHEIRA, J. C.; SAAD, M. A. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. **Diabetologia**. v. 55, p. 2823-2834, 2012.

CLAESSON, M. J.; CUSACK, S.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; WEERD, H.; FLANNERY, E.; MARCHESI, J. R.; FALUSH, D.; DINAN, T.; FITZGERALD, G.;

- STANTON, C.; SINDEREN, D.; O'CONNOR, M.; HARNEDY, N.; O'CONNOR, K.; HENRY, C.; O'MAHONY, D.; FITZGERALD, A. P.; SHANAHAN, F.; TWOMEY, C.; HILL, C.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W. Composition, variability and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 108, p. 4586-4591, 2011.
- DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINIE, 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**. v. 107, n. 33, p. 14691-14696, 2010.
- DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. **Nature**. v. 449, p. 811-818, 2007.
- DRIDI, B. H., KHÉCHINE, A. E.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. **Plos One**. v. 4, i. 9, e7063, 2009.
- ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEINS, C. N.; PURDON, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**. v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.
- FLINT, H. J.; BAYER, E. A.; RINCON, M. T.; LAMED, R.; WHITE, B. A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**. v. 6, p. 121-131, 2008.
- FRANK, D. N.; AMAND, A. L.; FELDMAN, R. A.; BOEDEKER, N. H.; HARPAZ, N.; PACE, N. R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, n. 34, p. 13780-13785, 2007.
- GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**. v. 312, n. 5778, p. 1355-1359, 2006.
- ISMAIL, N. A.; RAGAB, S. H.; ELBAKY, A. A.; SHOEIB, A. R. S.; ALHOSARY, Y.; FEKRY, D. Frequency of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Archives of Medical Science**. n. 7, v. 3, p. 501-507, 2011.
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**. v. 124, p. 837-848, 2006.
- LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial Ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature - Brief Communications**. v. 444, p. 1022-1023, 2006.
- LINDNER, M. S.; RENARD, B. Y. Metagenomic abundance estimation and diagnostic testing on species level. **Nucleic Acids Research**. v. 41, n. 1, 2013.

LOPETUSO, L. R.; SCALDAFERRI, F.; PETITO, V.; GASBARRINI, A. Commensal *Clostridia*: leading players in the maintenance of gut homeostasis. **Gut Pathogens**. v. 5, n. 23, 2013.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**. v. 489, p. 220-230, 2012.

MARTÍNEZ, I.; MULLER, C. E.; WALTER, J. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. **Plos One**. v. 8, i. 7, e69621, 2013.

MIQUEL, S.; MARTÍN, R.; ROSSI, O.; BERMUÚDEZ-HUMARAN, L. G.; CHATEL, J. M.; SOKOL, H.; THOMAS, M.; WELLS, J. M.; LANGELLA, P. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. **Current Opinion in Microbiology**. v. 16, p. 255-261, 2013.

NOOD, E. V.; VRIEZE, A.; NIEUWDORP, M.; FUENTES, S.; ZOETENDAL, E. G.; DE VOS, W. M.; VISSER, C. E.; KUIJPER, E. J.; BARTELSMAN, J. M.; TIJSSEN, J. P.; SPEELMAN, P.; DIJKGRAAF, M. W.; KELLER, J. J. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. **The New England Journal of Medicine**. v. 368, n. 5, p. 407-415, 2013.

OLIVEIRA, F. F. **Análise da diversidade da microbiota fecal de lactentes durante o primeiro ano de vida utilizando biblioteca 16S RNA**. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, M. V.; JEWELL, K. A.; FREITAS, F. S.; BENJAMIN, L. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C.; MORAES, C. A.; SUEN, G. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. **Veterinary Microbiology**. v. 164, n. 3, p. 307-314, 2013.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J. M.; HANSEN, T.; PASLIER, D. L.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORE, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J. METAHIT CONSORTIUM; BORK, P.; EHRLICH, S. D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**. v. 464, n. 4, p. 59-67, 2010.

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

REYES, A.; HAYNES, M.; HANSON, N.; ANGLY, F. E.; HEATH, A. C.; ROHWER, F.; GORDON, J. I. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. **Nature**. v. 466, n. 7304, p. 334-338, 2010.

SCANLAN, P. D.; SHANAHAN, F.; MARCHESI, J. R. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. **BMC Microbiology**. v. 8, n. 79, 2008.

SCHLOISSNIG, S.; ARUMUGAM, M.; SUNAGAWA, S.; MITREVA, M.; TAP, J.; ZHU A.; WALLER, A.; MENDE, D. R.; KULTIMA, J. R.; MARTIN, J.; KOTA, K.; SUNYAEV, S. R.; WEINSTOCK, G. M.; BORK, P. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. **Nature**. v. 493, p. 45-50, 2013.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**. v. 90, p. 859-904, 2010.

SOKOL, H.; PIGNEUR, B.; WATTERLOT, L.; LAKHDARI, O.; BERMUDEZ-HUMARAN, L. G.; GRATADOUX, J.; BLUGEON, S.; BRIDONNEAU, C.; FURET, J.; CORTHER, G.; GRANGETTE, C.; VASQUEZ, N.; POCHART, P.; TRUGNAN, G.; THOMAS, G.; BLOTTIERE, H. M.; DORE, J.; MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; LANGELLA, P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 105, n. 43, p. 16731–16736, 2008.

THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**. v. 486, p. 207-214, 2012.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. B.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH, A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**. v. 457, n. 7228, p. 480–484, 2009a.

WANG, M.; AHRNE, S.; JEPSSON, B.; MOLIN, G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 54, p. 219-231, 2005.

WRZOSEK, L.; MIQUEL, S.; NOORDINE, M.; BOUET, S.; CHEVALIER-CURT, M.; ROBERT, V.; PHILIPPE, C.; BRIDONNEAU, C.; CHERBUY, J.; ROBBE-MASSELOT, C.; LANGELLA, M.; THOMAS, M. *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**. v. 11, n. 61, 2013.

ZOETENDAL, E. G.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; DE VOS, W. M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**. v. 57, n. 11, p. 1605- 1615, 2008.

## **CAPÍTULO 4**

---

### **IMPACTO DA INGESTÃO DE *Lactobacillus plantarum* Lp-115 SOBRE A MICROBIOTA FECAL HUMANA**

---

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado de produtos lácteos, destacados entre um dos principais veículos carreadores de bactérias probióticas, tem obtido altos índices de investimento baseados tanto no valor nutritivo e sabor agradável destes produtos como também pela sua capacidade de exercer efeitos positivos sobre a saúde do consumidor (COSTA, 2011). Segundo o relatório de análise global da indústria, uma nova estimativa do mercado mundial de probióticos sugere um crescimento de 6,8% para os próximos quatro anos e revela que os alimentos lácteos ainda são os principais produtos comercializados como probióticos (DAIRY REPORTER, 2013).

A ingestão desses produtos é utilizada com o objetivo de reforçar e/ou modificar a microbiota intestinal em busca da manutenção ou restabelecimento do equilíbrio. Os mecanismos e eficácia dos efeitos probióticos dependem principalmente das interações entre os microrganismos probióticos e a microbiota única do hospedeiro ou com as células imunocompetentes da mucosa intestinal (BOAVENTURA et al., 2012).

Nesse cenário, *L. plantarum* é utilizado como probiótico em diversos países tanto em produtos lácteos como em outros alimentos, além de ser uma espécie flexível e versátil, encontrada em uma variedade de ambientes, sobretudo no TGI de humanos (WANG et al., 2010). As vias metabólicas descritas para esse microrganismo, bem como os mecanismos de regulação e funções dos genes estão sendo estudados e os resultados têm facilitado a troca de informações para uma melhor compreensão dos efeitos inerentes a *L. plantarum*. Além disso, já é estabelecido que os efeitos benéficos à saúde são considerados espécie e até linhagem-específicos (COSTA et al., 2014).

*L. plantarum* Lp-115 foi utilizado em estudos *in vitro* e *in vivo* que avaliaram sua segurança e funcionalidade. Os autores observaram que a linhagem exibiu um perfil seguro e alta sobrevivência no TGI, além de ter tido impactos positivos sobre os hospedeiros (DANIEL et al., 2006; PAINEAU et al., 2008).

Dessa forma, as propriedades tecnológicas e de saúde associadas a *L. plantarum* Lp-115, e o seu uso ainda restrito em alimentos para uso humano no Brasil, fazem deste microrganismo um alvo interessante às pesquisas (COSTA, 2011). Em face a quantidade escassa de informações a respeito do impacto de *L. plantarum* Lp-115 na microbiota fecal adulta, esse trabalho analisou amostras fecais de dois indivíduos saudáveis coletadas antes,

durante e após ingestão de um leite fermentado por esse microrganismo. A abordagem metagenômica, combinada a ferramentas de biologia molecular e de bioinformática, foi utilizada nessa investigação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

Um total de 1.455.256 leituras de sequências de alta qualidade (Tabela 1/Cap. 2) foram geradas a partir do material fecal de dois humanos saudáveis (selecionados aleatoriamente). Nomenclatura empregada: Y02 - sexo masculino (indivíduo 1), X35 - sexo feminino (indivíduo 2).

As seis amostras descritas nesse capítulo correspondem aos três períodos de avaliação (T0, T90, T+15) da terapia probiótica executada por Costa e colaboradores (2014). ‘T0’ representa o tempo 0 (antes da terapia probiótica), ‘T90’ o 90° dia de terapia (durante o consumo) e ‘T+15’ o período de 15 dias após a interrupção da terapia (pós consumo). Os métodos utilizados para o sequenciamento de DNA e interpretação dos dados foram abordados no Capítulo 2.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **3.1 PRESENÇA DO MICRORGANISMO ALVO NA MICROBIOTA FECAL**

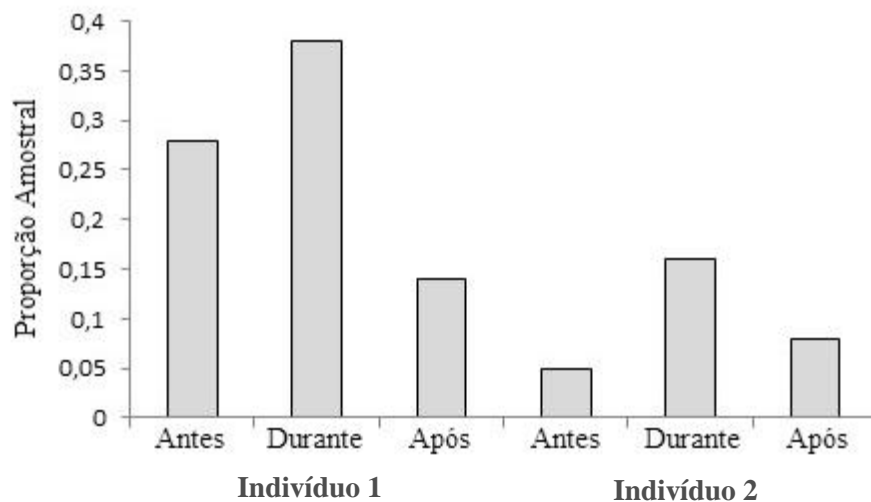
O *L. plantarum* foi detectado nas amostras dos dois indivíduos nos três períodos de avaliação (T0, T90 e T+15). Isso confirma observações de que este microrganismo faz parte da microbiota (autóctone ou alóctone) de indivíduos saudáveis, embora não seja o lactobacilo mais comumente relatado como integrante da microbiota fecal humana (TANNOCK et al., 2000; WANG et al., 2010; DHANANI; GAUDANA; BAGCHI, 2011; OZGUN; VURAL, 2011; BOSCH et al., 2012).

Costa e colaboradores (2014), pesquisadores do nosso grupo, avaliaram a microbiota fecal de um grupo de 61 (sessenta e um) humanos saudáveis e não detectaram *L. plantarum* nas fezes destes no tempo zero e/ou pós consumo, entretanto, em todos os períodos de

consumo o microrganismo foi detectado e quantificado na ordem de  $10^3 - 10^4$  n° de células/g fezes.

Nossos resultados estão de acordo com o relatado anteriormente. A detecção de *L. plantarum* tem os níveis aumentados durante o período de ingestão (Fig. 1). Visto que o total de sequências anotadas como RNA ribossomal, diferiu entre as seis amostras após a normalização (Tabela 1/Cap. 2), ajustes manuais foram realizados para obtenção da proporção amostral e possibilidade de comparação do microrganismo alvo nos diferentes períodos de avaliação (T0, T90 e T+15).

**Figura 1.** Gráfico com os valores da proporção amostral demonstrando a ocorrência de *L. plantarum* nas amostras fecais dos dois indivíduos nos três períodos de avaliação.



Os dois sujeitos dessa investigação fazem parte do universo de 61 indivíduos amostrados anteriormente por Costa e colaboradores (2014), no qual o microrganismo alvo foi monitorado por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As diferenças observadas no tempo zero e no pós consumo podem ser justificadas pelo limite de detecção dos métodos empregados.

Além disso, por abranger uma população maior, a descrição de Costa e colaboradores (2014) correspondeu aos valores médios de *L. plantarum* relacionado ao tempo zero, enquanto que nossos dados são provenientes de dois indivíduos, cuja composição da microbiota é bastante variável (Fig. 4/Cap. 3). Outros estudos também têm demonstrado uma

diversidade considerável da microbiota fecal entre indivíduos saudáveis (COSTELLO et al., 2009; CAPORASO et al., 2011b; THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012; MARTÍNEZ; MULLER; WALTER, 2013; SCHLOISSNIG et al., 2013).

Após a ingestão, as bactérias geralmente encontram numerosos sistemas de defesa que são associados a secreções, peristaltismo e ao próprio ambiente inóspito que é o TGI humano. São encontradas altas concentrações de mucinas (principal constituinte do muco) que cobrem o intestino, ácido gástrico que induz ao baixo pH do estômago e sais biliares secretados dentro do conteúdo luminal no intestino delgado (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Diferentes linhagens de *L. plantarum* demonstraram alta tolerância a exposição consecutiva de ácido clorídrico (pH 2,0), e sais biliares e isso foi observado tanto em cepas isoladas de amostras fecais quanto naquelas provenientes de alimentos fermentados (DE VRIES et al., 2006).

A presença aumentada do alvo (Fig. 1) (COSTA et al., 2014) confirma características tecnológicas e funcionais desejáveis, como viabilidade no leite fermentado, resistência a ambientes inóspitos e, conseqüente, potencial probiótico. Outros trabalhos também constataram por meio da detecção em fezes humanas que diferentes linhagens de *L. plantarum* possuem a capacidade de sobreviver à passagem através do TGI (BERGGREN et al., 2003; ÖNNING et al., 2003; GOOSSENS et al., 2005; GOOSSENS et al., 2006).

Wang e colaboradores (2009) observaram adesão de *L. plantarum* L2 e conseqüente aumento da resposta imune em células Caco-2 e IEC-6 em estudo *in vitro*. Posteriormente, utilizando camundongos, foram confirmados tanto a colonização do TGI, como a melhora do sistema imunológico *in vivo*.

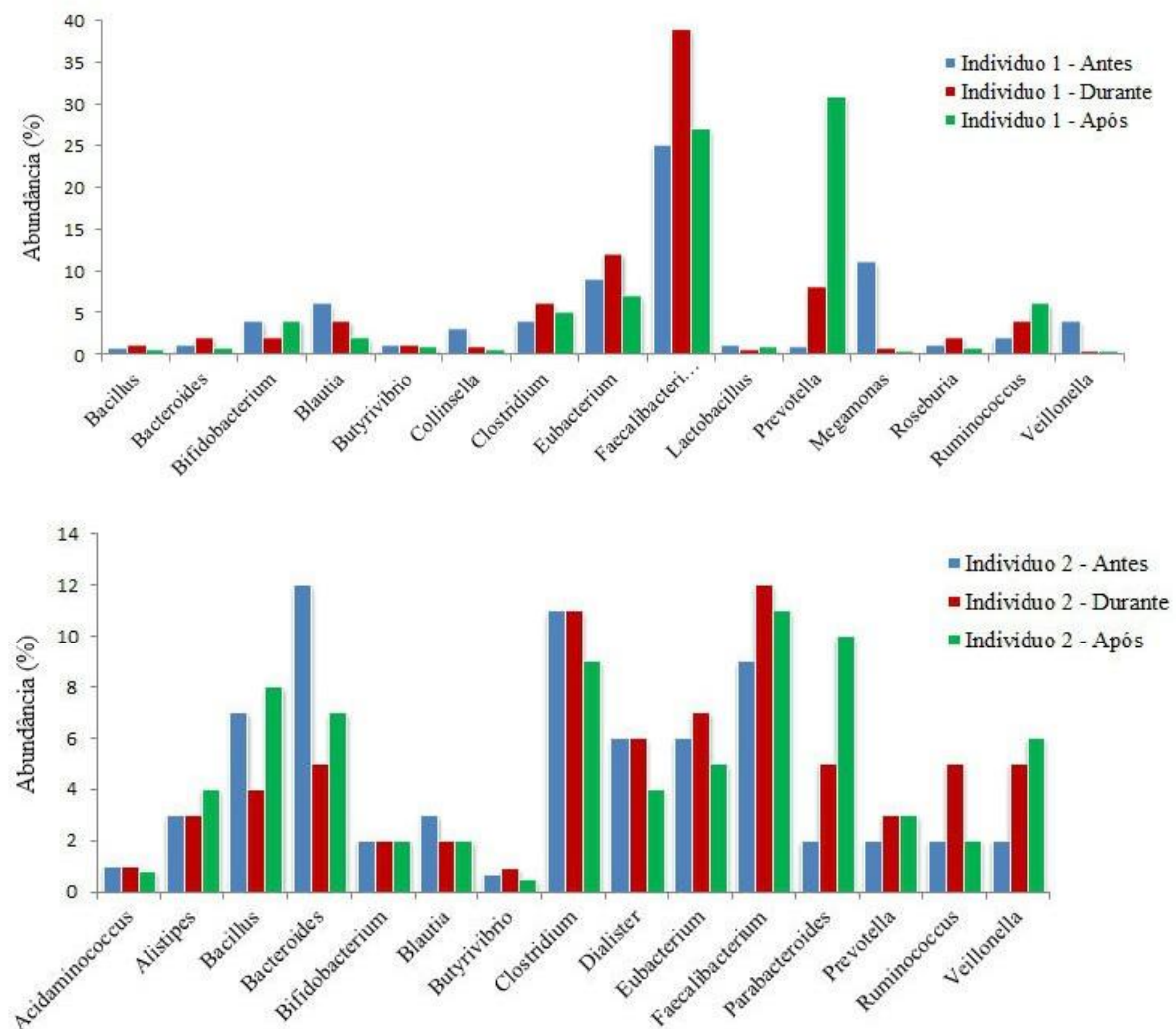
Entretanto, a antiga hipótese de que a colonização no intestino é necessária para que os probióticos exerçam seus efeitos benéficos tem sido contestada. A residência transitória pode ser suficiente para observação dos efeitos probióticos e criação temporária de um microambiente favorável e necessário para outros microrganismos intestinais, os quais conduzem aos benefícios clínicos ou fisiológicos (BERTAZZONI et al., 2013; COSTA et al., 2014). Por esse motivo, probióticos devem ser administrados constantemente.

### 3.2 IMPACTO DA INGESTÃO DE *L. plantarum* Lp-115 SOBRE A MICROBIOTA FECAL

A administração de uma linhagem probiótica específica geralmente resulta em um aumento (temporário) desta no TGI, mas também pode alterar a composição geral da microbiota intestinal. Segundo Gerritsen e colaboradores (2011), resultados de experimentos demonstram que as mudanças induzidas por probióticos na composição da microbiota não estão restritas às espécies ingeridas.

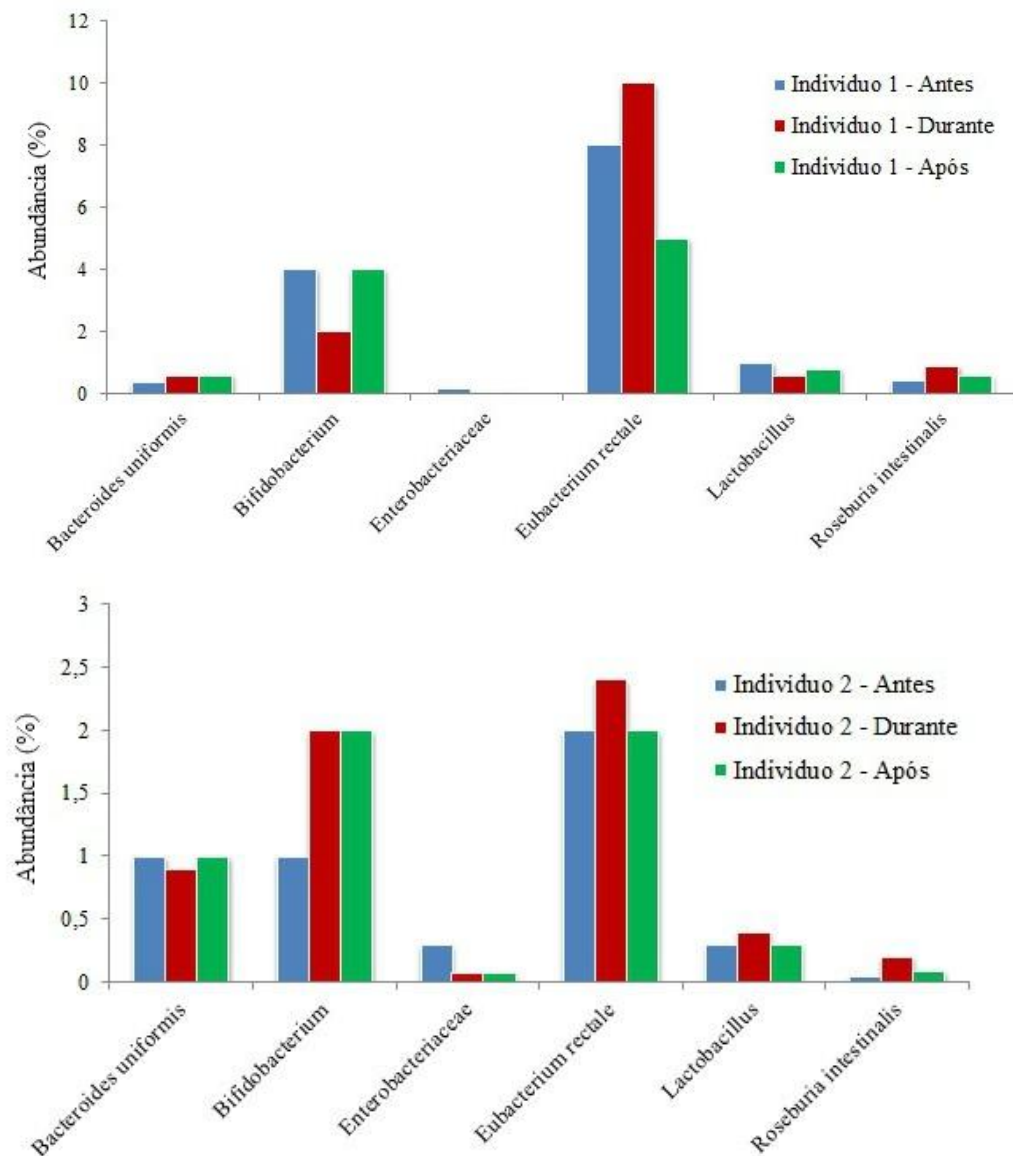
Nossos dados evidenciam essa alteração, onde a diversidade temporal da comunidade microbiana pode ser analisada por meio de histogramas de abundância das amostras. Os 15 gêneros mais abundantes em cada indivíduo nos três períodos de avaliação (T0, T90 e T+15) foram ordenados no eixo x e a respectiva abundância relativa a população total bacteriana foi marcada no eixo y (Fig. 2).

**Figura 2.** Histograma dos gêneros mais abundantes nos dois indivíduos nos três períodos de avaliação.



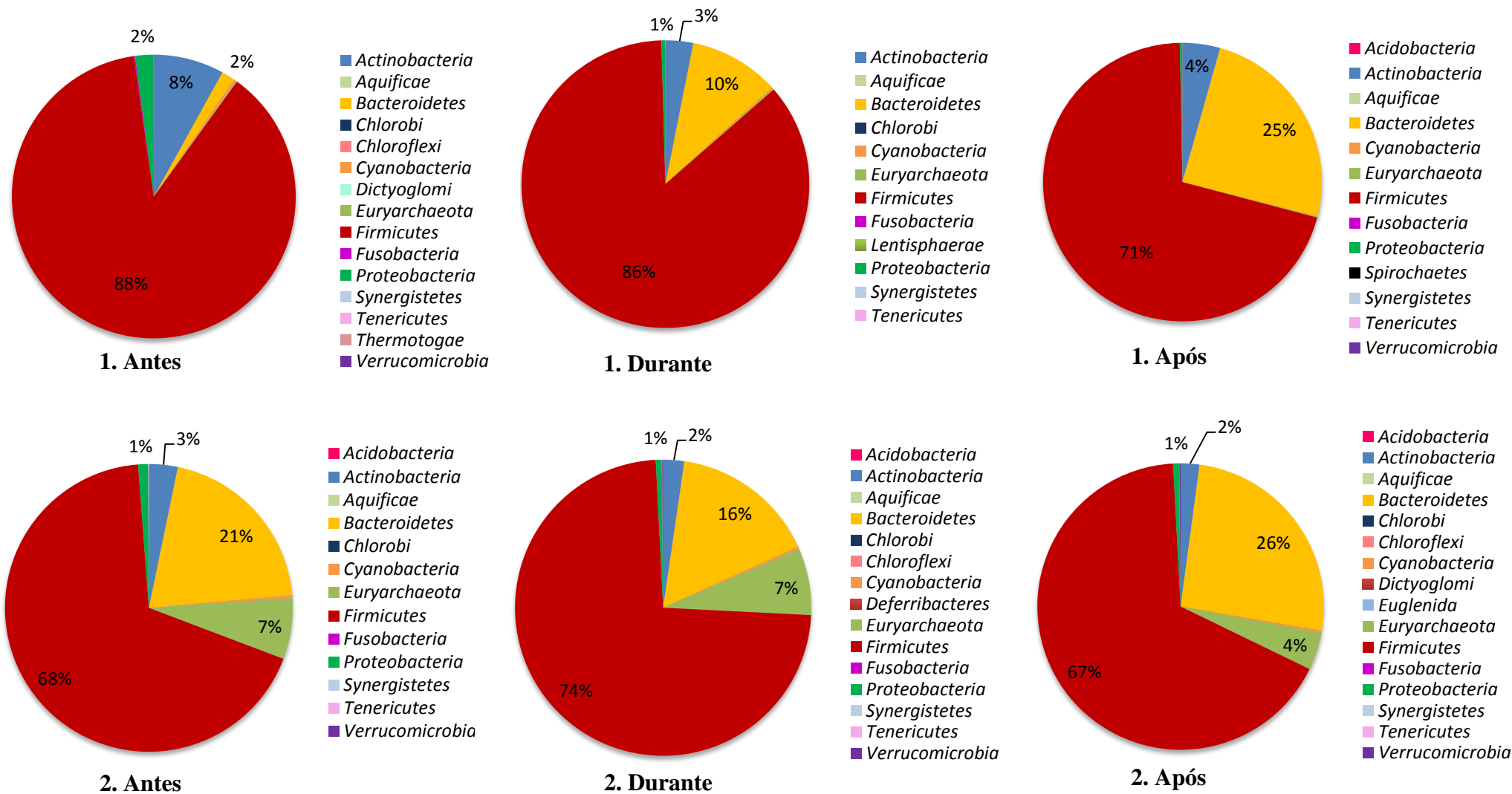
Para análise de maneira pontual, foram selecionados alguns grupos de importância e comuns entre os dois indivíduos (Fig. 3).

**Figura 3.** Histograma de abundância de grupos específicos nos dois indivíduos nos três períodos de avaliação.

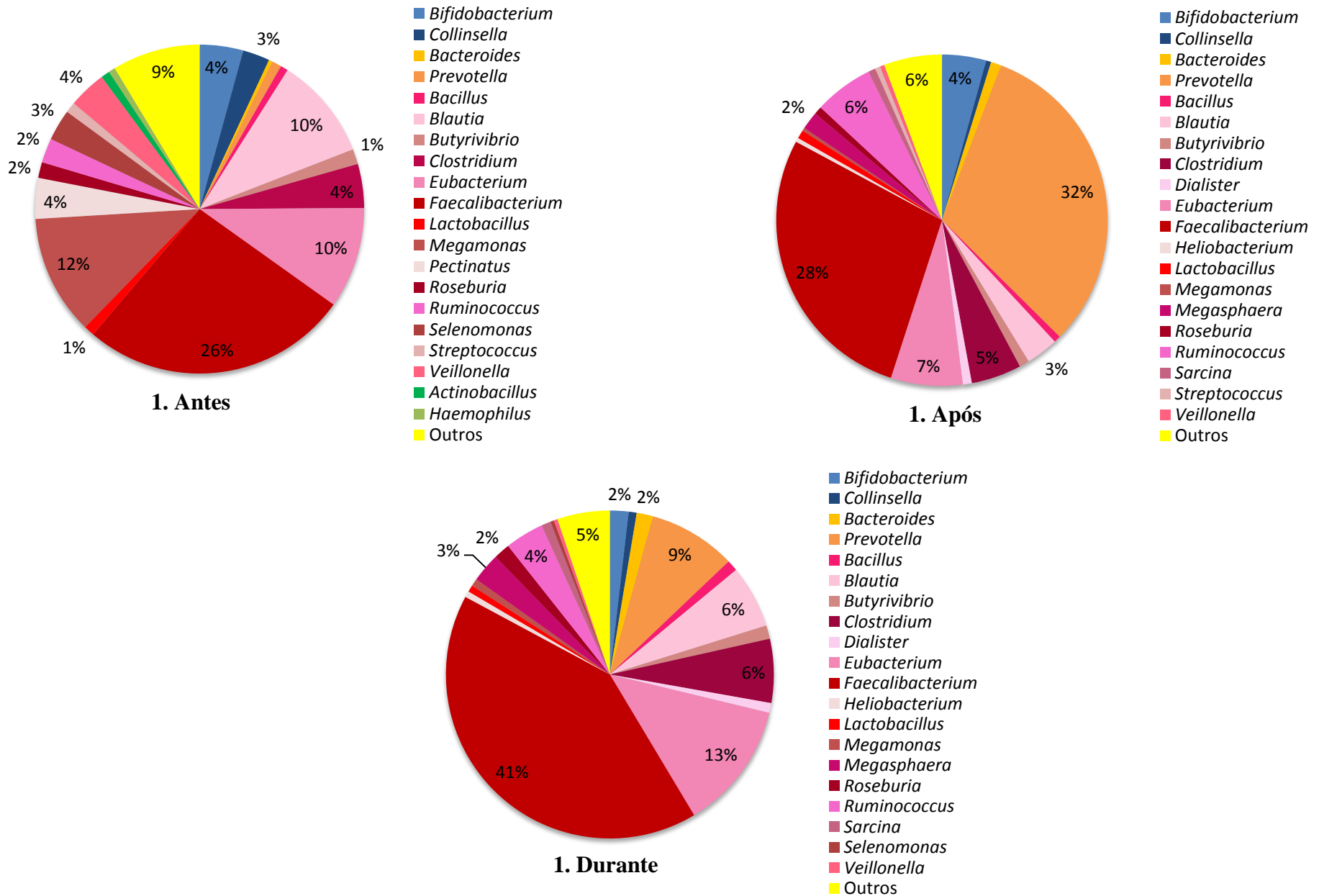


Durante e pós-consumo do produto fermentado por *L. plantarum* Lp-115 ocorreram mudanças no perfil geral da microbiota (Fig. 4). Além disso, ocorreram alterações de gêneros nos dois indivíduos (Figuras 5 e 6) quando comparados ao tempo zero (anterior ao consumo). Observa-se que a comunidade de lactobacilos demonstrou uma variação na composição (Fig. 7). Um total de 17 espécies de *Lactobacillus* foram detectadas nas seis amostras fecais.

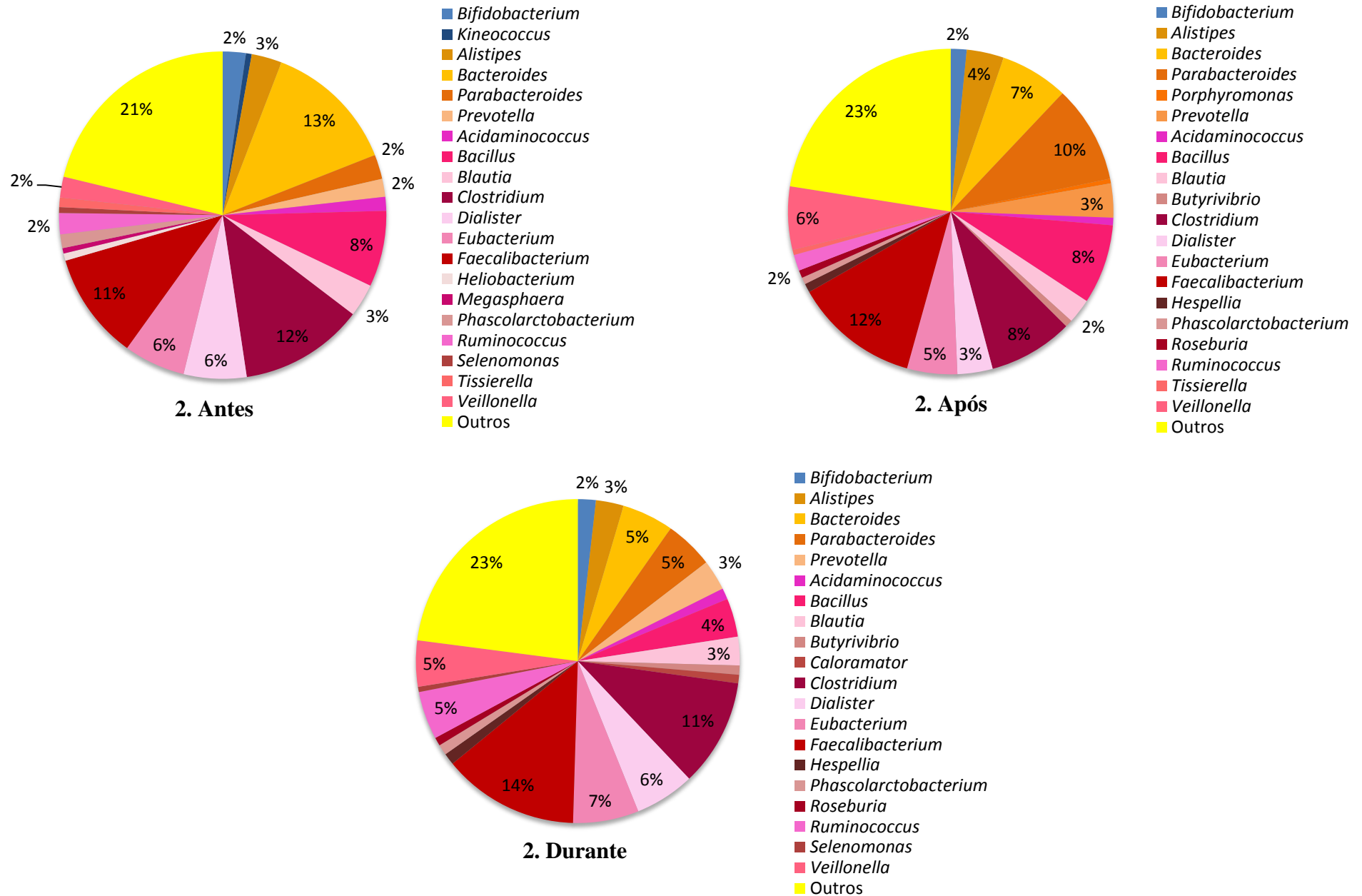
**Figura 4.** Dinâmica temporal do perfil de filos encontrados na microbiota fecal dos dois indivíduos. \*Os números 1 e 2 correspondem aos indivíduos.



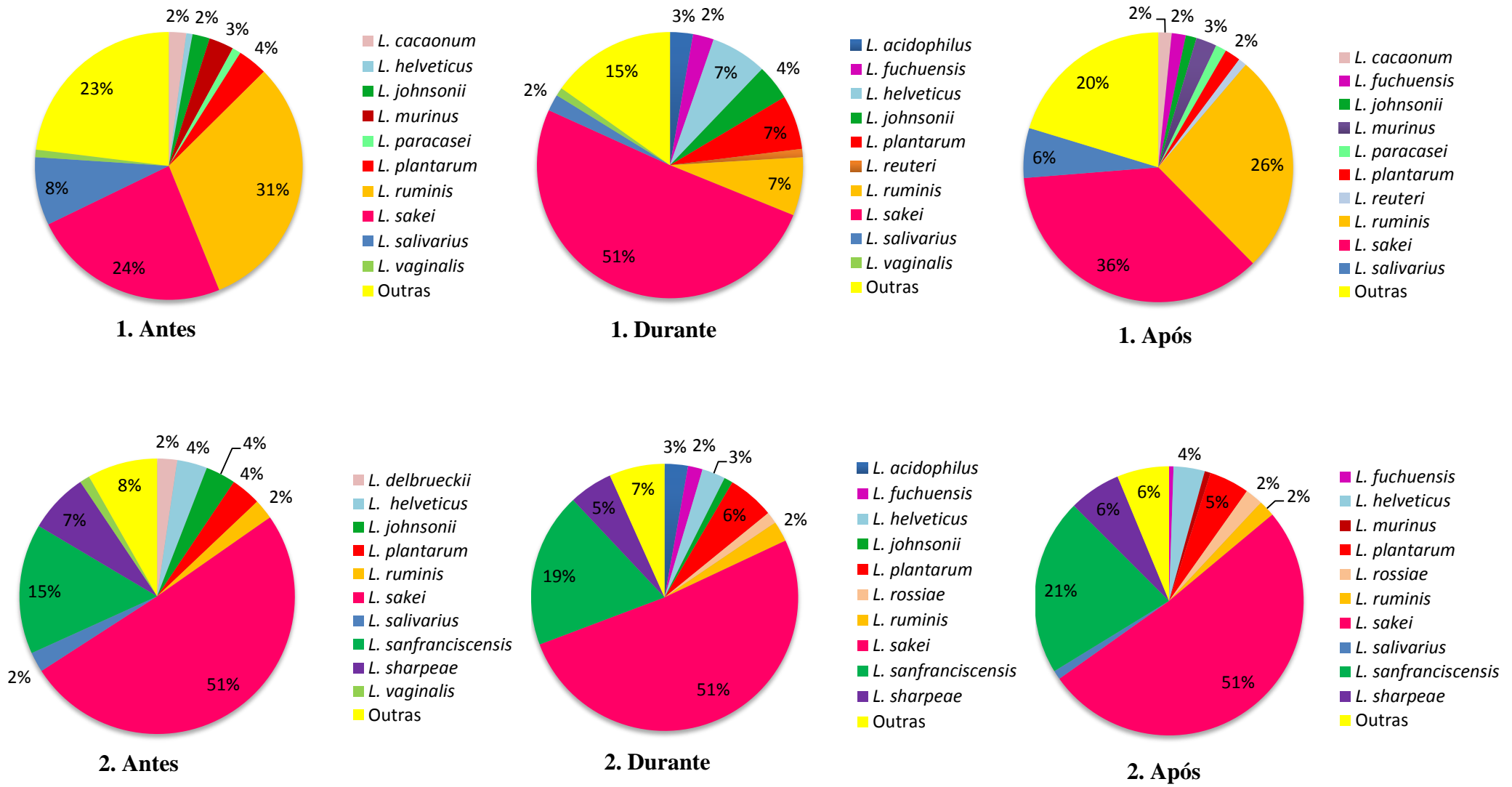
**Figura 5.** Dinâmica temporal do perfil de gêneros encontrados na microbiota fecal do indivíduo 1.



**Figura 6.** Dinâmica temporal do perfil de gêneros encontrados na microbiota fecal do indivíduo 2.



**Figura 7.** Dinâmica temporal das espécies de *Lactobacillus* detectadas na microbiota fecal dos dois indivíduos.



Visto que, desde a época de Metchnikoff, o conceito original de probióticos compreende uma diminuição de bactérias potencialmente patogênicas em determinado ambiente, a família *Enterobacteriaceae* e algumas espécies foram avaliadas para verificação dessa hipótese e análise do impacto de *L. plantarum* Lp- 115 sobre esses membros (Tabela 1).

Outras espécies pertencentes aos gêneros *Campylobacter*, *Aeromonas* e *Arcobacter* também foram pesquisadas em nossas sequências, no entanto, estas foram detectadas na microbiota fecal dos indivíduos em apenas um ou dois períodos de avaliação.

**Tabela 1.** Comparação da frequência de espécies potencialmente patogênicas encontradas na microbiota fecal dos indivíduos nos três períodos de avaliação. Os valores estão representados pela porcentagem em relação a população bacteriana total. \*Diminuição durante a ingestão.

Família/Espécie	Indivíduo 1			Indivíduo 2		
	Antes (%)	Durante (%)	Após (%)	Antes (%)	Durante (%)	Após (%)
<i>Bacillus cereus</i>	0,02	0,009*	0,008	0,01	0,03	0,02
<i>Clostridium perfringens</i>	0,2	0,1*	0,1	0,08	0,02*	0,07
<i>Clostridium botulinum</i>	0,09	0,08*	0,2	0,3	0,3	0,3
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,2	0,07*	0,03	0,3	0,07*	0,07
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,2	0,07*	0,05	0,06	0,09	0,05
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0,002	0,0009*	0,0004
<i>Salmonella enterica</i>	0,005	0,005	0,002	0,04	0,007*	0,003
<i>Shigella</i>	0,004	0,002*	0,0007	0,01	0,003*	0,002
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,08	0,01*	0,009	0,02	0,009*	0,01

Embora diversos mecanismos de ação de linhagens probióticas tenham sido sugeridos, alguns não estão completamente elucidados. Todavia, foi comprovado que microrganismos probióticos inibem o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas principalmente por meio da produção de compostos antimicrobianos, diminuição do pH do TGI e competição por sítios de adesão e nutrientes.

De acordo com os dados da tabela 1, a ingestão da linhagem probiótica *L. plantarum* Lp-115 diminuiu a porcentagem de espécies patogênicas analisadas, o que demonstra sua habilidade em reduzir bactérias patogênicas dentro do ambiente intestinal. Em comum nos

dois indivíduos, as porcentagens de *C. perfringens*, *Enterobacteriaceae*, *Shigella* e *S. aureus* diminuíram durante o consumo.

Finalmente, foram analisadas possíveis alterações na diversidade Alfa ( $\alpha$ ) causadas pelo microrganismo alvo. Esse indicador é muito similar à riqueza de espécies, porém além de conter o número de diferentes espécies, leva em conta também a proporção em que estas espécies ocorrem em determinado local ou habitat (abundância relativa). Esse parâmetro apresentou oscilações temporais e uma diminuição no indivíduo 1.

**Quadro 1.** Riqueza de espécies distintas descrita pelo número de anotações de espécies diferentes no conjunto de dados do MG-RAST.

	Indivíduo 1			Indivíduo 2		
	Antes	Durante	Após	Antes	Durante	Após
H': Índice de diversidade de <i>Shannon</i>	25,33	17,99	17,76	64,16	66,83	60,80

Nas últimas décadas, diversos estudos têm monitorado o impacto da ingestão de probióticos sobre a microbiota fecal humana, sendo destinados a determinar principalmente: se o microrganismo probiótico consegue sobreviver às etapas do TGI; se as mudanças induzidas por probióticos na população da microbiota intestinal podem ser medidas; e a duração dessas mudanças observadas.

A maioria dos estudos que avaliaram o impacto de linhagens de *L. plantarum* na microbiota fecal humana são baseados em métodos tradicionais de cultivo microbiano, os quais recuperam apenas espécies cultiváveis e analisam membros específicos da comunidade microbiana (JOHANSSON et al., 1993; JOHANSSON et al., 1998; KINGAMKONO; SJOGREN; SVANBERG, 1999; ÖNNING et al., 2003; BERGGREN et al., 2003; GOOSSENS et al., 2005; GOOSSENS et al., 2006). Visto que dentre as 1000 espécies que compõem o TGI, apenas cerca de 10% são cultiváveis fora do ambiente intestinal (RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004; ECKBURG et al., 2005; SEKIROV et al., 2010), as técnicas tradicionais não demonstram uma diversidade confiável da microbiota fecal.

Ainda assim, alguns desses estudos demonstraram que, entre outros efeitos, o consumo de *L. plantarum* reduziu as contagens de *Enterobacteriaceae* na microbiota fecal humana (JOHANSSON et al., 1993; JOHANSSON et al., 1998; KINGAMKONO; SJOGREN; SVANBERG, 1999), como observado em nossos resultados referentes aos dois indivíduos. A família *Enterobacteriaceae* consiste em diversos gêneros autóctones da microbiota comensal, no entanto, é importante por abrigar alguns grupos patogênicos como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e *E. coli*.

Relativo à inibição de bactérias patogênicas, o indivíduo 1 apresentou uma diminuição do filo *Proteobacteria*, conhecido por conter membros comensais, patogênicos e oportunistas (*Salmonella*, *Shigella*, *Helicobacter* spp., *Escherichia*) como habitantes do intestino humano. No período anterior ao consumo do produto probiótico, 2% do total de sequências de rRNA estavam alinhadas contra membros desse filo, durante o consumo, 1% do total de sequências e pós-consumo a porcentagem caiu para menos de 1%. Apesar de geralmente representar menos de 1% da microbiota fecal de humanos adultos, proteobactérias são consideradas a maior causa de doenças intestinais e extra-intestinais (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010).

A diversidade Alfa, parâmetro de medida da variabilidade local, não foi aumentada durante o consumo do microrganismo alvo. No entanto, as características e flutuações temporais da microbiota fecal dos indivíduos reveladas durante esse estudo suportam o conceito de um ecossistema que opera para um estado de homeostase e demonstra resiliência a perturbações causadas tanto pelo microrganismo probiótico quanto pela dieta.

Em relação a dieta, ainda não está completamente elucidado o quão rapidamente as bactérias do intestino respondem a uma mudança drástica dos alimentos ingeridos. David e colaboradores (2014) demonstraram que o consumo de uma dieta composta inteiramente por alimentos animais ou de plantas altera rapidamente a estrutura da comunidade microbiana humana e a expressão de seus genes. Outros autores também constataram que a dieta possui efeitos significativos sobre a microbiota fecal (TURNBAUGH et al., 2009b; WU et al., 2011).

Considerando que os dois sujeitos investigados não realizaram mudanças acentuadas em suas dietas nos períodos de investigação, observações sobre o efeito do microrganismo alvo podem ser realizadas (levando em consideração possíveis alterações provenientes da dieta durante a amostragem). Apesar das populações de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* não terem apresentado um aumento importante no TGI durante o consumo do leite fermentado por

*L. plantarum*, outros microrganismos podem ter sido impactados e, conseqüentemente, ter alterado a composição geral da microbiota fecal (Figuras 5 e 6).

Em relação aos lactobacilos, a literatura sugere que apenas um número pequeno desses são “verdadeiros habitantes” ou membros autóctones do TGI humano. Grande parte das espécies presentes são membros alóctones derivados, por exemplo, de alimentos fermentados ou da cavidade oral (WALTER, 2008).

A maioria das sequências (44%) de *Lactobacillus* foram alinhadas contra a espécie *L. sakei*, que foi abundante em ambos os indivíduos. Embora outros autores também tenham reportado a presença desse microrganismo como um dos lactobacilos predominantes na microbiota fecal humana (WALTER, 2008; CHIARAMONTE et al., 2009), alguns estudos indicam que essa é a principal espécie de *Lactobacillus* associada à alimentos (WALTER et al., 2001; HEILIG et al., 2002; DAL BELLO et al., 2003).

De acordo com Stsepetova e colaboradores (2011), *L. sakei* já foi isolada naturalmente de carnes, salsichas e chucrutes, além de ser utilizada na produção de produtos cárneos fermentados. Dessa forma, para o estabelecimento de quais espécies de *Lactobacillus* são membros autóctones ou alóctones, seriam necessárias amostragens de vários instantes e períodos mais prolongados (cerca de um ano).

Nos três meses e meio de avaliação, a comunidade de lactobacilos demonstrou uma variação na composição dependendo do sujeito analisado (Fig. 7). O indivíduo 1 apresentou uma menor estabilidade, principalmente da espécie *L. sakei* que pode ter sido estimulada pela presença do microrganismo alvo e/ou a dieta. Uma vez que a proporção de *L. sakei* retornou ao estado inicial no pós-consumo, provavelmente Lp-115 pode ter influenciado a dinâmica da população de lactobacilos. Por outro lado, o indivíduo 2 demonstrou-se mais estável nesse aspecto durante as amostragens.

Variações mais expressivas foram observadas em relação a bactéria *F. prausnitzii* que apresentou os níveis aumentados nos dois indivíduos durante o consumo do produto probiótico e uma diminuição no pós-consumo (Fig 2). *F. prausnitzii* é descrita com uma das principais produtoras de butirato no intestino humano, tendo seu papel protetor em condições inflamatórias avaliado e comprovado em modelos animais de colite (MIQUEL et al., 2013; QIU et al., 2013).

Segundo Neef e Sanz (2013) uma redução representativa de *F. prausnitzii* tem sido reportada em indivíduos com síndrome do intestino irritável, câncer colorretal, obesidade e

atopias variadas. Além disso, esses autores confirmam a eficácia dessa espécie na melhora de inflamações e disfunções metabólicas, e ainda afirmam que esse microrganismo pode fazer parte da próxima geração de probióticos. Dessa forma, a persistência temporária de Lp-115 como microbiota alóctone (no período de ingestão), parece ter favorecido o aumento desse microrganismo benéfico em detrimento de espécies patogênicas, especialmente no indivíduo 1 que demonstrou um aumento acentuado deste durante o consumo.

Geralmente probióticos podem restaurar ou estimular linhagens bacterianas essenciais e necessárias para a maturação do intestino e homeostase, principalmente em hospedeiros onde esse processo de manutenção saudável foi interrompido ou é incompleto (PATEL; LIN, 2010). Assim, o foco apenas no aumento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* por intermédio de probióticos simplifica o estudo do impacto destes na microbiota fecal humana. À medida que o “quebra-cabeça” dos componentes da microbiota começou a ser desvendado, outros membros como *F. prausnitzii*, *B. uniformis*, *E. rectale* e *R. intestinalis* foram propostos na lista de microrganismos benéficos (SANDERS, 2011; NEEF; SANZ, 2013). Além de *F. prausnitzii*, os dois últimos são produtores de butirato e apresentaram os níveis aumentados durante a administração de Lp-115, seguido de um retorno ao estado inicial no pós-consumo (Fig. 3).

Wang e colaboradores (2014), também demonstraram que o consumo de *L. plantarum* Lp-8 modulou a microbiota fecal de indivíduos saudáveis. Bactérias benéficas, *Bifidobacterium*, *Atopobium*, *E. rectale* e *F. prausnitzii* foram aumentadas, enquanto grupos de patógenos oportunistas, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, foram suprimidos. Os autores também relaram efeitos sobre os níveis de AGCCs, do anticorpo IgA e de ácidos totais biliares.

Além da melhora e aumento das funções benéficas no TGI e por consequência, no hospedeiro, outro aspecto importante da residência temporária de microrganismos probióticos (como microbiota alóctone) e que não foi abordado em nosso estudo, é a capacidade que esses microrganismos possuem em deixar suas “marcas” na comunidade microbiana, tanto ao mudar a expressão de genes dos membros autóctones (no sentido de alterar as vias metabólicas dentro da célula) quanto estimulando ou “acalmando” a resposta imune (PATEL; LIN, 2010). McNulty e colaboradores (2011) propuseram que probióticos podem não somente alterar as proporções de bactérias de nossa microbiota, mas principalmente impactar a expressão de genes bacterianos e produção de metabólitos bacterianos.

## REFERÊNCIAS

- BERGGREN, A.; SÖDERBERG, L.; ÖNNING, G.; HAGSLÄTT, M. L.; AXELSSON, I. Intestinal function, microflora and nutrient intake of children after administration of a fermented oat product containing *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v). **Microbial Ecology in Health and Disease**. v. 15, p. 160-168, 2003.
- BERTAZZONI, E.; DONELLI, G.; MIDTVEDT, T.; NICOLI, J.; SANZ, Y. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? **Journal of Chemotherapy**. v. 25, n. 4, p. 193-212, 2013.
- BOAVENTURA, C.; AZEVEDO, R.; UETANABARO, A.; NICOLI, J.; BRAGA, L. G. The benefits of probiotics in human and animal nutrition. In: BRZOZOWSKI, T. **New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology**. Croatia: InTech, 2012, p. 75-100.
- BOSCH, M.; RODRIGUEZ, M.; GARCIA, F.; FERNÁNDEZ, E.; FUENTES, M. C.; CUÑÉ, J. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 isolated from faeces of healthy children. **Letters in Applied Microbiology**. v. 54, p. 240-246, 2012.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; COSTELLO, E. K.; BERG-LYONS, D.; GONZALEZ, A.; STOMBAUGH, J.; KNIGHTS, D.; GAJER, P.; RAVEL, J.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Moving pictures of the human microbiome. **Genome Biology**. v. 12, n. 50, p. 1-8, 2011b.
- CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nature Reviews Immunology**. v. 10, p. 735-744, 2010.
- CHIARAMONTE, F.; BLUGEON, S.; CHAILLOU, S.; LANGELLA, P.; ZAGOREC, M. Behavior of the meat-borne bacterium *Lactobacillus sakei* during its transit through the gastrointestinal tracts of axenic and conventional mice. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 13, p. 4498-4505, 2009.
- COSTA, G. A. N. **Identificação e monitoramento de *Lactobacillus plantarum* em alimentos e humanos com uso de ferramentas moleculares**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
- COSTA, G. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; VILAS-BÔAS, G. T.; MATSUO, T.; MIGLIORANZA, L. H. S. Potential fate of ingested *Lactobacillus plantarum* and its occurrence in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 80, n. 3, p. 1013-1019, 2014.
- COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**. v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 2009.
- DAIRY REPORTER, S. Starling. **Global probiotics market to grow 6.8% annually until 2018**. Jan-2013. Disponível em: <<http://www.dairyreporter.com/Markets/Global-probiotics-market-to-grow-6.8-annually-until-2018?>>. Acesso em: 28 fev. 2014.

DAL BELLO, F.; WALTER, J.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. **Microbial Ecology**. v. 45, n. 4, p. 455-463, 2003.

DANIEL, C.; POIRET, S.; GOUDERCOURT, D.; DENNIN, V.; LEYER, G.; POT, B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 9, p. 5799–5805, 2006.

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

DE VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 1018-1028, 2006.

DHANANI, A. S.; GAUDANA, S. B.; BAGCHI, T. The ability of *Lactobacillus* adhesin EF-Tu to interfere with pathogen adhesion. **European Food Research and Technology**. v. 232, p. 777-785, 2011.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEINS, C. N.; PURDON, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**. v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

GERRITSEN, J. SMIDT, H.; RIJKERS, G. T.; DE VOS, W. M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**. v. 6, p. 209-240, 2011.

GOOSSENS, D. M.; Jonkersa, D.; Russela, M.; Thijsa, A. Survival of the probiotic, *L. plantarum* 299v and its effects on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition. **Digestive and Liver Disease**. v. 37, p. 44-50, 2005.

GOOSSENS, D. M.; JONKERS, D. E.; RUSSEL, M. M.; STOBBERINGH, E. E.; STOCKBRÜGGER, R. W. The effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 23, p. 255-263, 2006.

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

HEILIG, H. G.; ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D.; DE VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 1, p. 114-123, 2002.

JOHANSSON, M. L.; MOLIN, G.; JEPSSON, B.; NOBAEK, S.; AHRNÉ, S.; BENGMARK, S. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, p. 15-20, 1993.

JOHANSSON, M. L.; NOBAEK, S.; BERGGREN, A.; NYMAN, M.; BJÖRCK, I.; AHRNÉ, S.; JEPPSSON, B.; MOLIN, G. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content in faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. **International Journal of Food Microbiology**. v. 42, p. 29-38, 1998.

KINGAMKONO, R.; SJOGREN, E.; SVANBERG, U. Enteropathogenic bacteria in faecal swabs of young children fed on lactic acid-fermented cereal gruels. **Epidemiology & Infection**. v. 122, n. 1, p. 23-32, 1999.

MARTÍNEZ, I.; MULLER, C. E.; WALTER, J. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. **Plos One**. v. 8, i. 7, e69621, 2013.

McNULTY, N. P.; YATSUNENKO, T.; HSIAO, A.; FAITH, J. J.; MUEGGE, B. D.; GOODMAN, A. L.; HENRISSAT, B.; OOZEER, R.; COOLS-PORTIER, S.; GOBERT, G.; CHERVAUX, C.; KNIGHTS, D.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R.; DUNCAN, A. E.; BAIN, J. R.; MUEHLBAUER, M. J.; NEWGARD, C. B.; HEATH, A. C.; GORDON, J. I. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. **Science Translation Medicine**. v. 106, n. 3, 2011.

MIQUEL, S.; MARTÍN, R.; ROSSI, O.; BERMUÚDEZ-HUMARAN, L. G.; CHATEL, J. M.; SOKOL, H.; THOMAS, M.; WELLS, J. M.; LANGELLA, P. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. **Current Opinion in Microbiology**. v. 16, p. 255-261, 2013.

NEEF, A.; SANZ, Y. Future for probiotic science in functional food and dietary supplement development. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 16, p. 679-687, 2013.

ÖNNING, G.; BERGGREN, A.; DREVELIUS, M.; JEPPSSON, B.; LINDBERG, A.; HAGSLÄTT, J. Influence of a drink containing different antioxidants and *Lactobacillus plantarum* 299v on plasma total antioxidant capacity, selenium status and faecal microbial flora. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 54, n. 4, p. 281-289, 2003.

OZGUN, D.; VURAL, H. C. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. **Journal of Medical Genetics and Genomics**. v. 3, n. 3, p. 46-49, 2011.

PAINEAU, D.; CARCANO, D.; LEYER, G.; DARQUY, S.; ALYANAKIAN, M.; SIMONEAU, G.; BERGMANN, J.; BRASSART, D.; BORNET, F.; OUWEHAND, A. C. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 53, p. 107-113, 2008.

PATEL, R. M.; LIN, P. W. Developmental biology of gut-probiotic interaction. **Gut Microbes**. v.1, n. 3, p. 186-195, 2010.

QIU, X.; ZHANG, M.; YANG, X.; HONG, N.; YU, C. *Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**. v. 7, n. 11, p. 558-568, 2013.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**. v. 38, p. 525–52, 2004.

SANDERS, M. E. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v. 45, p. 115-119, 2011.

SCHLOISSNIG, S.; ARUMUGAM, M.; SUNAGAWA, S.; MITREVA, M.; TAP, J.; ZHU A.; WALLER, A.; MENDE, D. R.; KULTIMA, J. R.; MARTIN, J.; KOTA, K.; SUNYAEV, S. R.; WEINSTOCK, G. M.; BORK, P. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. **Nature**. v. 493, p. 45-50, 2013.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**. v. 90, p. 859-904, 2010.

STSEPETOVA, J.; SEPP, E.; KOLK, H.; LOIVUKENE, K.; SONGISEPP, E.; MIKELSAAR, M. Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly. **British Journal of Nutrition**. v. 105, p. 1235-1244, 2011.

TANNOCK, G. W.; MUNRO, K.; HARMSSEN, H. J. M.; WELLING, G.; SMART, J.; GOPAL, P. K. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 6, p. 2578-2588, 2000.

THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**. v. 486, p. 207-214, 2012.

TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translation Medicine**. v. 1, n. 6, 2009b.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W.; LIS, C. M.; MUNRO, L.; HAMMES, W. P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2578-2585, 2001.

WALTER, J. Ecological role of Lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 16, p. 4985–4996, 2008.

WANG, B.; LI, J.; LI, Q.; ZHANG, H.; LI, N. Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by *Lactobacillus plantarum* L2 in the rat gastrointestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**. v. 132, n. 1, p. 59-66, 2009.

WANG, C.; LIN, P.; NG, C.; SHYU, Y. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. **Anaerobe**. v. 16, p. 578-585, 2010.

WANG, L.; ZHANG, J.; GUO, Z.; KWOK, L.; MA, C.; ZHANG, W.; LV, Q.; HUANG, W.; ZHANG, H. The impact of oral consumption of the probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 on the faecal microbiota, SIgA, SCFAs and TBAs of subjects of different age. **Nutrition**. 2014.

WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y.; KEILBAUGH, S. A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; SINHA, R.; GILROY, E.; GUPTA, K.; BALDASSANO, R.; NESSEL, L.; LI, H.; BUSHMAN, F. D.; LEWIS, J. D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**. v. 334, n. 6052, p. 105-108, 2011.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a metagenômica seja uma abordagem recente que cresce rapidamente, poucos estudos que utilizam essa estratégia são realizados no Brasil. Apesar das dificuldades inerentes a caracterização de um ecossistema complexo, é possível a obtenção de resultados interessantes, em busca de um melhor entendimento sobre a microbiota fecal humana e a ação de probióticos nesse ambiente.

Os estudos de microrganismos probióticos geralmente são baseados na avaliação de sua persistência no TGI e também na capacidade que a linhagem possui em reduzir bactérias potencialmente patogênicas no ambiente intestinal. Em trabalho prévio executado por Costa e colaboradores (2014), amostras fecais de indivíduos suplementados com *L. plantarum* Lp-115 foram avaliadas e constatou-se a permanência do microrganismo alvo durante a ingestão.

O presente estudo investigou por meio da diversidade bacteriana, o impacto da ingestão de *L. plantarum* Lp-115 no balanço microbiano de dois voluntários adultos e saudáveis. Durante e pós-consumo de um leite fermentado por essa linhagem ocorreram mudanças no perfil geral dos filos e gêneros dos indivíduos quando comparados ao período anterior ao consumo. Embora pequenas flutuações temporais possam ter ocorrido devido a dieta, alguns microrganismos benéficos, como *F. prausnitzii*, *E. rectale* e *R. intestinalis*, apresentaram os níveis aumentados durante o consumo, provavelmente estimulados pela presença do microrganismo alvo. Além disso, as porcentagens de *C. perfringens*, *Enterobacteriaceae*, *Shigella* e *S. aureus* em relação a população bacteriana total, foram reduzidas durante o consumo do produto probiótico.

Apesar dos benefícios da administração de probióticos serem reconhecidos e bem documentados, os mecanismos pelos quais estes microrganismos manifestam a ação positiva ainda são alvo de discussões. Acredita-se que uma mudança na composição ou diversidade da microbiota fecal pela intervenção probiótica não pode ser considerada um efeito benéfico por si só. Entretanto, os meios pelos quais os probióticos parecem alcançar tais efeitos dão-se por intermédio do impacto direto ou indireto sobre as populações ou atividades da microbiota autóctone.

Os resultados desse trabalho evidenciaram a importância de *L. plantarum* Lp-115 como microrganismo probiótico ao alterar o balanço microbiano e induzir possíveis alterações positivas à saúde do hospedeiro. Adicionalmente, este estudo contribuiu para um conhecimento mais aprofundado sobre a composição da microbiota fecal humana de adultos brasileiros.

**ANEXO 1.** Questionário de avaliação de hábitos alimentares e estilo de vida realizados com os dois sujeitos amostrados no presente estudo.

Solicitamos a gentileza de sua leitura e resolução das questões abaixo para a coleta de dados referente a dissertação “Impacto da ingestão de *Lactobacillus plantarum* Lp-115 sobre a microbiota fecal humana”.

1) Você consumia: (assinale com o número correspondente a frequência)

\*5 - em excesso = todos os dias, mais de uma vez ao dia

- ( ) Açúcar
- ( ) Peixes
- ( ) Carne de aves
- ( ) Carne vermelha
- ( ) Ovos
- ( ) Arroz
- ( ) Feijão
- ( ) Macarrão
- ( ) Farinhas
- ( ) Doces
- ( ) Saladas de folhas e legumes

1	2	3	4	5
Muito pouco		Moderado		Em excesso

2) Ingeria bebidas:

- ( ) Refrigerante
- ( ) Refrigerante diet/light
- ( ) Sucos de frutas (industrializado)
- ( ) Cerveja
- ( ) Destilados
- ( ) Vinho

1	2	3	4	5
Mensalmente		Semanalmente		Diariamente

3) Quantidade diária de ingestão de água?

- ( ) Mais de 2 litros
- ( ) Aproximadamente 1 litro
- ( ) Menos de 1 litro

4) Frequência de consumo de frutas? (assinale com um X)

- ( ) Mais de uma porção ao dia  
 ( ) Uma porção ao dia  
 ( ) Esporadicamente  
 ( ) Nunca consumia fruta

5) Frequência de consumo de alimentos integrais? (assinale com um X)

- ( ) Todos os dias  
 ( ) Semanalmente  
 ( ) Esporadicamente  
 ( ) Não consumia nada integral

6) Consumo de produtos industrializados: (assinale com o número correspondente a frequência)

- ( ) Barras de cereais  
 ( ) Salgadinhos fritos  
 ( ) Batata frita  
 ( ) Bolachas recheadas  
 ( ) chocolates

1	2	3	4	5
Mensalmente		Semanalmente		Diariamente

7) Consumo de Laticínios:

- ( ) Leite  
 ( ) Queijos  
 ( ) Iogurtes  
 ( ) Manteiga

1	2	3	4	5
Mensalmente		Semanalmente		Diariamente

5) Peso:

6) Altura:

7) Você era fumante: (assinale com um X)

- Ativo
- Passivo
- Nunca fumei

8) Você praticava alguma atividade física ou esporte (caminhada, corrida, bicicleta, musculação, natação etc):

- Menos de 1 vez por semana
- 1-2 vezes por semana
- 3 vezes por semana
- 4 vezes por semana
- 5 ou mais vezes por semana

**ANEXO 2.** Quarenta espécies dominantes na microbiota fecal dos indivíduos identificadas pelo MG-RAST.

<b>Indivíduo 1</b>						
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Abundância
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	23129
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Megamonas</i>	<i>Megamonas hypermegale</i>	9467
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium rectale</i>	6764
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Blautia</i>	<i>Blautia hansenii</i>	4695
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Pectinatus</i>	<i>Pectinatus frisingensis</i>	2311
<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Collinsella</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>	2096
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus obeum</i> A2-162	2014
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1726
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>Selenomonas sputigena</i>	1656
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Veillonella atypica</i>	1583
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39BFAA	1540
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	1051
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Veillonella dispar</i>	1023
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	1007
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Pectinatus</i>	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	911
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium bifforme</i>	861
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>	788
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium hylemonae</i>	726
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> A4	701
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Blautia</i>	<i>Blautia schinkii</i>	682
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Roseburia</i>	<i>Roseburia faecis</i>	682
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella copri</i>	512
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium eligens</i>	508
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Roseburia</i>	<i>Roseburia inulinivorans</i>	494
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium cylindroides</i> T2-87	457

<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Sarcina ventriculi</i>	442
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Megasphaera</i>	<i>Megasphaera elsdenii</i>	438
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Coprococcus</i>	<i>Coprococcus catus</i>	425
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	422
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium tertium</i>	399
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Parvimonas</i>	<i>Parvimonas micra</i>	385
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus gnavus</i>	331
<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Gordonibacter</i>	<i>Gordonibacter pamelaiae</i>	316
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium scindens</i>	298
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium bolteae</i>	292
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>	275
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium lituseburense</i>	257
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus torques</i> L2-14	248
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	235
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	228

Indivíduo 2						
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Abundância
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	4885
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	3564
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	2768
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	2765
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Dialister</i>	<i>Dialister invisus</i>	2534
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2277
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	2241
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Coprococcus</i>	<i>Coprococcus catus</i>	1348
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Blautia</i>	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	1080
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Alistipes</i>	<i>Alistipes finegoldii</i>	1027
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium rectale</i>	989
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	850
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides caccae</i>	831
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	777
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>	719
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	715
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides uniformis</i>	703
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium A4</i>	701
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Acidaminococcus</i>	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	697
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>	<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	686
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Veillonella atypica</i>	655
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Parabacteroides merdae</i>	653
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella maculosa</i>	591
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Dialister</i>	<i>Dialister micraerophilus</i>	572
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	535
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium siraeum</i>	512
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus simplex</i>	476
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus clausii</i>	467
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	461

<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Alistipes</i>	<i>Alistipes putredinis</i>	444
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	417
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium asparagiforme</i>	376
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium hathewayi</i>	302
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium xylanolyticum</i>	289
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Parvimonas</i>	<i>Parvimonas micra</i>	283
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Blautia</i>	<i>Blautia hansenii</i>	275
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>	269
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	261
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium scindens</i>	239
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	216