

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CRIANÇAS COM DOENÇA
FALCIFORME EM USO CRÔNICO DE ANTIBIOTICOPROFILAXIA**

ORIENTANDO: **EDUARDO GOMES DE OLIVEIRA**
ORIENTADOR: PROF. DR. **ÁLVARO CANTINI NUNES**
COORIENTADOR: PROF. DR. **FÁBIO DAVID COUTO**

BELO HORIZONTE
ABRIL - 2020

EDUARDO GOMES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME
EM USO CRÔNICO DE ANTIBIOTICOPROFILAXIA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Genética.

BELO HORIZONTE
ABRIL – 2020

043

Oliveira, Eduardo Gomes de.

Avaliação da microbiota intestinal de crianças com doença falciforme em uso crônico de antibioticoprofilaxia [manuscrito] / Eduardo Gomes de Oliveira. – 2020.

102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Álvaro Cantini Nunes. Coorientador: Fábio David Couto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Anemia Falciforme. 3. Antibioticoprofilaxia. 4. Microbioma Gastrointestinal. I. Nunes, Álvaro Cantini. II. Couto, Fábio David. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



"AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME EM USO CRÔNICO DE ANTIBIOTICOPROFILAXIA"

Eduardo Gomes de Oliveira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Álvaro Cantini Nunes - Orientador
UFMG

Fábio David Couto - Coorientador
UFRB

Renan Pedra de Souza
UFMG

Ricardo David Couto
UFBA

Ana Cácia Freire dos Santos
UNIVASF

Maria Raquel Santos Carvalho
UFMG

Belo Horizonte, 04 de junho de 2020.

“Ninguém encontra aquilo que não procura, e aquele que não sabe o que procura se contenta com o que acha”.

Adaptado de Charles Darwin, livro origem das espécies.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver, pelo cuidado de todos os dias, pela luz do conhecimento libertador;

A família, por ser a força motriz que impulsiona a minha vida, razão do meu viver;

Ao professor Dr. Fábio David Couto, amigo, irmão de alma, através do qual, esse trabalho foi aprovado no PPSUS;

A meu orientador Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes pela paciência, compreensão, disponibilidade, conhecimento, pela capacidade de condução e por aceitar orientar, até então, um desconhecido;

Ao parceiro e amigo de pesquisa Adriano de Souza Santos Monteiro pelo total empenho e compromisso com o desenvolvimento dessa pesquisa;

A Dr^a Patrícia Costa Lima da Silva e ao Prof. Dr. Renan Pedra de Souza por todo suporte no processamento e análise das informações geradas neste trabalho.

A UFOB, por proporcionar essa capacitação, e em especial a PROPGPI nas pessoas das Profa. Dra. Luciana Lucas Machado e Profa. Dra. Daniela Cristina Calado;

Aos parceiros: Universidade Federal do Recôncavo Baiano-UFRB; Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia- FAR/UFBA; Secretaria de Saúde dos municípios baianos de Valença, Taperoá, Igrapiúna e Ituberá, as Associações de Portadores de Doença Falciforme de Ilhéus (BA) e Feira de Santana (BA), e a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais -APAE de Salvador, por permitirem a coleta e toda a logística;

A Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG por proporcionar, através do Programa de Pós-graduação em Genética essa oportunidade;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB por todo custeio.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1- TRATO GASTROINTESTINAL.....	11
1.1.1- CÉLULAS INTESTINAIS E A MICROBIOTA	11
1.1.2- DIETA E A MICROBIOTA	14
1.1.3-MICROBIOTA	15
1.1.3.1- RELAÇÃO DA MICROBIOTA COM A PERMEABILIDADE INTESTINAL	18
1.1.3.2- RELAÇÃO DA MICROBIOTA COM SISTEMA IMUNE	18
1.1.3.3- PRODUÇÃO DE VITAMINAS E NEUROTRANSMISSORES PELA MICROBIOTA INTESTINAL	21
1.1.3.4- HIPÓTESE DA HIGIENE	22
1.1.3.5- MECANISMOS DE INTERFERÊNCIA POSITIVA NA MICROBIOTA INTESTINAL	23
1.1.3.6- MECANISMOS DE INTERFERÊNCIA NEGATIVA NA MICROBIOTA INTESTINAL	25
1.2- DOENÇA FALCIFORME	25
1.2.1-TERAPIA DA DOENÇA FALCIFORME	27
1.3- DIAGNÓSTICO DE DISBIOSES E FUNCIONAMENTO INTESTINAL	28
1.3.1- GENE 16S RIBOSSÔMICO - 16S rRNA	29
1.3.2- SEQUENCIAMENTO COM O SISTEMA MISEQ DA ILLUMINA	29
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1- PARCERIAS	34
3.2-ASPECTOS ÉTICOS	35
3.3-TAMANHO DA AMOSTRA	35
3.4- COLETA DAS AMOSTRAS DE FEZES	36
3.5- EXTRAÇÃO DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)	36
3.6- AMPLIFICAÇÃO 16S rRNA E PRODUÇÃO DE BIBLIOTECAS	36
3.7- SEQUENCIAMENTO DE DNA	37
3.8- ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	37
3.9- PROGRAMA ESTATÍSTICO EMPREGADO	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

4.1-RESULTADOS METAGENÔMICOS E ÍNDICES DE DIVERSIDADE	46
4.2-COMPOSIÇÃO E VARIAÇÕES TAXONÔMICAS ENTRE DF E CTL	52
4.2.1- ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE SHANNON ENTRE FILOS BACTERIANOS DO GRUPO DE CRIANÇA COM DF E GRUPO CTL.	55
4.2.2- ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE SIMPSON ENTRE FILOS BACTERIANOS DOS DF E CTL	56
4.2.3- ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE CHAO-1 ENTRE OS FILOS BACTERIANOS DOS DF E CTL	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
6. REFERÊNCIAS	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Escala de Score Phred.....	31
Tabela 02- Exemplo de comunidades com mesmo população amostral, porém com divergencia no Índice de Diversidade de Shannon (H').....	38
Tabela 03- Exemplos de como calcular os: Índice de Simpson (D); Índice de Diversidade de Simpson (1-D); e o Índice Recíproco de Simpon (1/D).....	39
Tabela 04- Exemplos de comunidade com o mesmo Índice de Diversidade de Shannon, porém com formatação comunitária divergente.....	40
Tabela 05- Significados dos símbolos para o cálculo do índice de diversidade ACE.....	42
Tabela 06- Dados descritivos dos grupos avaliados com DF (n=30) e controle (n=28).....	43
Tabela 07- Número de <i>reads</i> por indivíduos do grupo DF e CTL após processamento no Mothur.....	46
Tabela 08 - Índices de Diversidade de Simpson (1-D), Shannon (H') e Chao-1 por individuo no grupo DF e CTL.....	48
Tabela 09 - Distribuição de OTUs nos principais filós bacterianos.....	53
Tabela 10 - Abundância relativa das famílias bacterianas mais frequentes.....	57
Tabela 11 - Principais filós e famílias encontradas nos grupos avaliados com sua respectiva classificação colorimétrica.....	62
Tabela 12 - Abundância relativa de 74 gêneros mais representativos no microbioma fecal de provenientes dos grupos de crianças com DF e CTL.....	67
Tabela 13 - Gêneros bacterianos e médias da abundância relativa $\geq 1\%$ em amostras de fezes oriundas do grupo de crianças com DF e grupo CTL.....	70
Tabela 14 – Gêneros da microbiota intestinal com divergência de abundância entre as amosras de fezes obtidas de crianas com DF e grupo CTL e exemplos de publicações acerca de interações com o hospedeiro ou com variações ambientais.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Sistema imune do Intestino. Fonte: Campos (2010).....	13
Figura 02- Mecanismo de adesão entre as células intestinais. Fonte: Rodrigues <i>et al.</i> (2016).	13
Figura 03- Redes de co-ocorrência dos três enterotipos. Fonte: Arumugam <i>et al.</i> (2011).....	17
Figura 04- Sinalização envolvendo LPS/TLR- na ativação do fator de transcrição NFκB. LPS- Lipopolissacario; TLR -Toll Like Receptor; LBP- Lipopolysaccharide Binding Protein; Proteína CD14; MD-2-proteína mieloide diferenciadora 2; NFκB-Fator Nuclear kappa B; IκB-alfa- proteína inibidora do NFκB; MAPK- mitogen-activated protein kinase; AP-1-activator protein 1; IRF3- interferon-regulatory factor 3 . Fonte: (CRUZ-MACHADO, 2010).....	20
Figura 05- Sistema de sequenciamento MiSeq da Illumina. Fonte: Illumina, (2018)	30
Figura 06- Mapa destacando os municípios baianos onde foram realizadas coletas de fezes.....	34
Figura 07-Distribuição dos Índices antropométricos do grupo de crianças com doença falciforme e os controle.	43
Figura 08- Medição da diversidade alfa através de estimadores de riqueza Chao1 e ACE e índices de diversidade Shannon e Simpson, a partir de amostras de fezes de crianças com DF em antibioticoprofilaxia crônica e grupo controle.....	49
Figura 09 - Diversidade beta da microbiota intestinal de crianças com DF em antibioticoprofilaxia crônica e grupo controle.....	50
Figura 10- Diversidade beta da microbiota intestinal de crianças com DF em antibioticoprofilaxia crônica e grupo controle nascidos de parto vaginal e cesariano.....	51
Figura 11- Principais filos encontrados na análise do microbioma em amostras de fezes de crianças com DF e grupo controle.....	54
Figura 12- Principais filos encontrados na análise do microbioma a partir de amostras de fezes de crianças com DF.....	54
Figura 13- Principais filos encontrados na análise do microbioma a partir de amostras de fezes de crianças do grupo CTL.....	55
Figura 14- Índice de Diversidade de Shannon (H') entre os quatro filos mais abundantes, <i>Actinobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Firmicutes</i> e <i>Proteobacteria</i> , a partir de amostras de fezes de crianças com DF e grupo controle.....	55
Figura 15- Índice de Diversidade de Simpson (1-D) por comparação dos quatro filos mais abundantes: <i>Actinobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Firmicutes</i> e <i>Proteobacteria</i> , em	

amostras de fezes de crianças com DF e grupo CTL.....	56
Figura 16- Índice de Diversidade de Chao-1, por comparação dos quatro filos mais abundantes: <i>Actinobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Firmicutes</i> e <i>Proteobacteria</i> , em amostras de fezes de crianças com DF e grupo CTL.....	57
Figura 17- Principais famílias de bactérias encontradas na análise do microbioma a partir de amostras de fezes de crianças com DF em antibioticoprofilaxia e grupo controle.....	58
Figura 18- Abundância relativa do gênero <i>Blautia</i> no microbioma de amostras fecal de crianças com DF e grupo CTL.....	60
Figura 19- Abundância relativa dos enterotipos (<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> e <i>Ruminococcus</i>) no microbioma fecal do grupo de crianças com DF e grupo CTL.....	65

RESUMO

A Doença Falciforme (DF) acarreta um mal funcionamento do baço aumentando a susceptibilidade de crianças com idade abaixo de cinco anos a recorrentes e graves infecções, principalmente por *Streptococcus pneumoniae*. Assim, até o quinto ano de vida, período de maior ocorrência de óbitos e complicações graves, os cuidados profiláticos representam a essência do tratamento, como o uso de penicilina e o ácido fólico. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a microbiota intestinal de pacientes com Doença Falciforme em uso crônico de antibioticoprofilaxia. O microbioma bacteriano das fezes de 30 crianças com DF e 28 crianças controles foi avaliado através de Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) de uma região hipervariável do gene 16S rRNA. O grupo de crianças com DF apresenta menor diversidade da microbiota intestinal medida pelos índices de diversidade alfa Chao1, ACE, Shannon e Simpson, e o grupo com DF apresenta maior dissimilaridade dentro do grupo e entre os controles demonstrada por análise da diversidade beta, através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Na avaliação taxonômica, os quatro filos bacterianos mais abundantes, em ambos os grupos de crianças, são *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, enquanto entre as arqueias, 98% pertencem a *Metanobrevibacter*. Entre as *Archaeae*, 98% das OTUs obtidas, pertenciam a *Metanobrevibacter*, com menor frequência e abundância relativa (AR) nos DF. No nível de família, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* aparecem com mais de 50% da AR. O grupo com DF apresenta diferença significativa nas famílias de bactérias Gram-negativo, com maior abundância de *Bacteroidaceae* e *Enterobacteriaceae*, o que provavelmente aumenta a disponibilidade da endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) no intestino. Dos 40 gêneros bacterianos, apenas dez são mais abundantes em DF em comparação ao controle: *Bacteroides*, *Blautia*, *Erysipelatoclostridium*, *Eggerthella*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Hungatella*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group*, *Rothia* e *Megamonas*.

Palavras-chave: Doença Falciforme; Antibioticoprofilaxia; Microbiota intestinal

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) causes a malfunction of the spleen increasing the susceptibility of children under the age of five to recurrent and severe infections, mainly by *Streptococcus pneumoniae*. Thus, until the fifth year of life, the period with the highest occurrence of deaths and serious complications, prophylactic care represents the essence of treatment, such as the use of penicillin and folic acid. This work aimed to evaluate the intestinal microbiota of patients with sickle cell disease in chronic use of antibiotic prophylaxis. The stool bacterial microbiome of 30 children with SCD and 28 controls was analyzed using the 16S rRNA gene, using New Generation Sequencing-NGS (Next Generation Sequencing) on Illumina's MiSeq platform. Data from the main alpha diversity indices (Chao1, ACE, Shannon and Simpson) show that the group with SCD has less diversity in the intestinal microbiota. When beta diversity was assessed, through Principal Coordinate Analysis - PCoA, the group with SCD presented greater dissimilarity within the group and among the controls. In the taxonomic evaluation, the four most abundant phyla in both groups were Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria. Among the Archaea, 98% of the OTUs obtained, belonged to *Metanobrevibacter*, with less frequency and AR in the SCD. At the family level, Lachnospiraceae and Ruminococcaceae appear with more than 50% of AR. The group with SCD showed a statistical difference in the families of gram-negative bacteria, with greater abundance of *Bacteroidaceae* and *Enterobacteriaceae*, which increases the availability of the LPS endotoxin in the intestine lumen. Of the 40 divergent genera, only ten were more abundant in the SCD when compared to CTL: *Bacteroides*, *Blautia*, *Eggerthella*, *Erysipelatoclostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Hungatella*, *Megamonas*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* and *Rothia*.

Keywords: intestinal microbiota; Sickle Cell Disease; Antibiotic Prophylaxis

INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal está relacionada com importantes funções no hospedeiro, antagonizando microrganismos patogênicos, reduzindo as respostas inflamatórias, modulando o sistema imunológico, influenciando na absorção de eletrólitos, na produção de vitaminas, na síntese de neurotransmissores, na geração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como fonte de energia para os colonócitos, interferindo no metabolismo energético, etc. A composição definitiva dessa microbiota é estabelecida por volta dos dois anos de idade e mudanças na sua diversidade estão relacionadas a autismo, diabetes, obesidade, diarreia, queda da resposta imune, má absorção de nutrientes, aumento no número de casos de hipersensibilidade, câncer, insuficiência cardíaca, transtornos psíquicos, inflamação sistêmica e outras complicações. Tais alterações de composição são condicionadas por questões genéticas, alimentares, ambientais e medicamentosas, sendo o uso dos antimicrobianos os principais fatores limitantes no desenvolvimento dessa microbiota. Desta forma, doenças como a anemia falciforme, que apresentam imunodepressão e como consequência o uso de antibioticoprofilaxia nos cinco primeiros anos de vida, podem ter importantes alterações na composição da microbiota intestinal com relevantes consequências para qualidade de vida dos pacientes (BRANDT *et al.*, 2006; WALL *et al.*, 2009; BOKULICH *et al.*, 2016).

1.1- Trato Gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é um tubo que se inicia na boca e termina no ânus, apresenta no seu percurso variações anatômicas e histológicas, além de órgãos e glândulas acessórias. No passado, o entendimento da sua finalidade era exclusivamente de realizar a digestão (mecânica, enzimática, química e fermentativa) e absorção dos nutrientes. Atualmente, sabe-se que o TGI se destaca também por exercer barreira imune e atividades neuroendócrinas com efeitos sistêmicos, que lhe dão o status de “segundo cérebro”, conhecido como eixo cérebro-intestinal. Assim, para que haja plenitude no desempenho de suas funções o TGI deve manter uma intersecção de equilíbrio entre células intestinais, dieta e microbiota (GUYTON e HALL, 2011; CARABOTTI *et al.*, 2015; BRZOZOWSKI, 2016;).

1.1.1- Células intestinais e a microbiota

O interior do intestino é revestido por mucosa, que histologicamente se organiza em dobraduras, que formam projeções voltadas para o lúmen, denominadas de vilosidades,

intercaladas por invaginações chamadas de criptas intestinais. Nas criptas encontram-se as Células Troncos do Intestino (CTI), que garantem a renovação celular através da geração de células progenitoras, que a medida que se multiplicam e migram em direção apical, diferenciam-se em células absorptivas como os enterócitos ou em uma das três células secretoras como as caliciformes, as de Paneth e as enteroendócrinas (CAMPOS, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2016).

As células caliciformes são responsáveis pela síntese de muco, que lubrifica o intestino, evitando lesão celular causada pelo atrito da passagem do alimento. Esse muco serve como fonte de nutrientes para certos grupos de microrganismos e diminui a permeabilidade do intestino a microrganismos patogênicos e suas moléculas antigênicas, como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). As células de Paneth, localizadas na região mais inferior das criptas, sintetizam proteínas antibacterianas (RegIII- γ , catecilidina-37 e lisozimas) que auxiliam no controle da proliferação de microrganismos. As células enteroendócrinas apresentam vários subtipos celulares que produzem substâncias como gastrina, histamina, colicistoquinina, secretina, enterogastrona, serotonina, grelinas, peptídeo YY, incretinas etc. O principal mecanismo para a liberação endócrina intestinal e produção de muco está intimamente relacionado a fatores intrínsecos condicionados a dieta e a atividade da microbiota, que em conjunto, ativam as células secretoras (DOUGLAS e CISTERNAS, 2004; CAMPOS, 2010; GUYTON e HALL, 2011).

Além das células supracitadas, o TGI alberga 80% das células imunes ativas, que juntamente com a microbiota intestinal desempenham importante função no combate aos patógenos (WALL *et al.*, 2009; ANDRADE, 2010). O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é formado pelas Placas de Peyer (PP) e linfócitos intraepiteliais (Fig. 1), e o seu padrão de desenvolvimento está ligado à presença de microrganismos no intestino. Trabalhos com ratos livres de germes mostram atrofia de linfonodos mesentéricos, das PP, bem como das vilosidades intestinais, evidenciando a importância dessa microbiota para o desenvolvimento da barreira imune intestinal (CAMPOS, 2010).

A mucosa do TGI é revestida por uma monocamada de células epiteliais, as quais apresentam um sistema de adesão intercelular, denominado de junções firmes, que juntamente com a camada de muco são responsáveis por controlar a permeabilidade intestinal. Essas estruturas de adjeção celular exercem função de barreira semipermeável entre a porção apical e basolateral dos enterócitos, regulando a passagem de íons, solutos e água pelo espaço paracelular (CAMPOS, 2010; GUYTON e HALL, 2011).

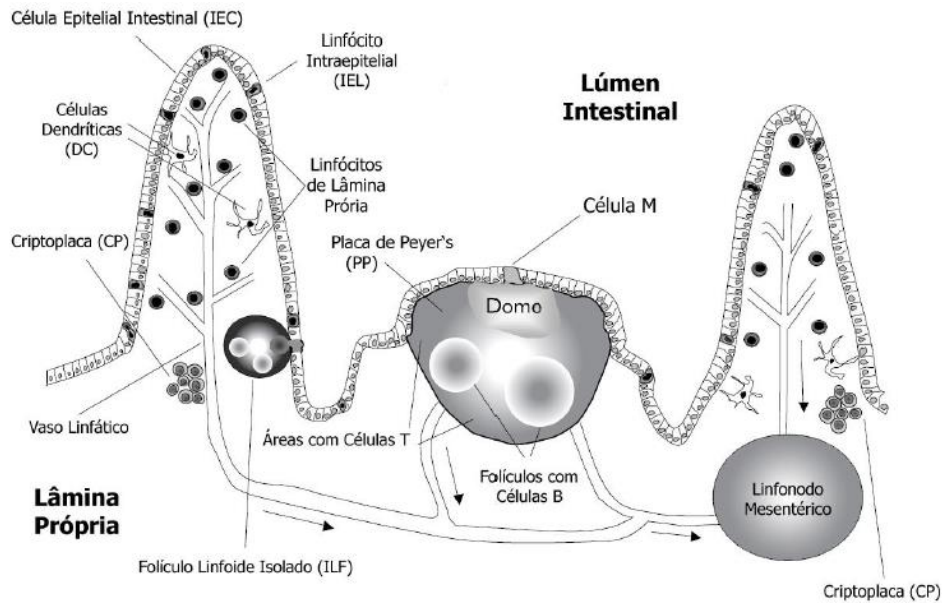


Figura 01- Sistema imune do Intestino. Fonte: Campos (2010).

As junções firmes ou oclusivas são formadas por um conjunto de proteínas transmembranares (Claudina, Ocludina e Moléculas de Adesão Juncionais) e intracelulares (Zônula Ocludente - ZO), que permitem a união do enterócito na célula adjacente. As Claudinas e Ocludinas formam alças extracelulares que se unem às alças das células vizinhas, garantido além da adesão a formação de poros entre as células envolvidas. As suas alças intracelulares, através da ZO, aderem-se ao citoesqueleto e garantem a ancoragem celular. No entanto, o padrão de expressão e montagem dessas proteínas está ligado à composição da microbiota, principalmente relacionado à estimulação de mediadores pro-inflamatórios e síntese de AGCC, e isso portanto, interfere no padrão de permeabilidade intestinal (SCHUMANN, 2005).

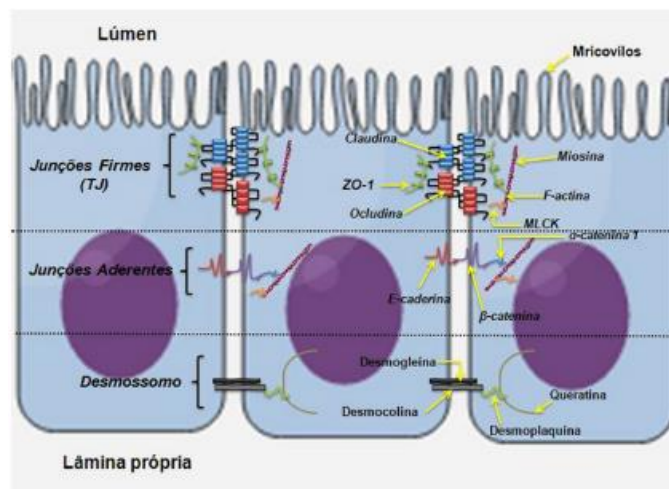


Figura 02- Mecanismo de adesão entre as células intestinais. Fonte: Rodrigues *et al.* (2016).

A maturação da barreira intestinal inicia-se no período pós-natal e coincide com a alimentação enteral e o estabelecimento da microbiota. Importante salientar que a imaturidade dessa barreira permite ao recém-nascido, nas suas primeiras horas de vida, absorver proteínas inteiras, como os anticorpos maternos presente no colostro, através do espaço paracelular (UDALL, 1981; WALKER, 2002)

1.1.2- Dieta e a microbiota

A dieta fornece ao hospedeiro a matéria-prima necessária para seus processos metabólicos como a produção de energia, síntese de proteína e a divisão celular, garantindo dessa forma a homeostase do indivíduo. Porém a dieta interfere na composição da microbiota intestinal, que por sua vez também é capaz de interferir na dieta, aumentando e/ou diminuindo a disponibilidade do alimento que chega no TGI. Dietas hiperlipídicas e pobres em fibras, por exemplo, aumentam a permeabilidade intestinal e diminuem a diversidade bacteriana, enquanto que dietas ricas em fibras aumentam AGCC, como butirato, que aumentam a expressão dos genes de mucina (MUC1, MUC2, MUC3 e MUC4), aumentam a montagem das junções firmes através da ativação de proteína cinase ativada por AMP (AMPK) e conseqüentemente diminuem a permeabilidade a patógenos e moléculas antigênicas (JUNG, 2015).

O tipo de dieta, além de interferir na diversidade da microbiota intestinal, é responsável pelo tipo de ácidos graxos de cadeia curta produzidos por essas bactérias. Uma importante função dos microrganismos intestinais é o processo denominado de salvamento energético, onde produtos não digeridos nem absorvidos no intestino delgado são utilizados para a produção de AGCC, como acetato, butirato e propionato, principais fontes de energia para os colonócitos (cerca de 60 a 70% da sua necessidade energética) (BARBOSA *et al.*, 2010). Estudos indicam também que o butirato, através de interferência no padrão de metilação do DNA e acetilação das histonas, limitam o crescimento de células cancerígenas, reduzem a expressão de fatores pro-inflamatórios como a IL-1 β , IL-6 e o TNF- α e estimulam células enteroendócrinas (BERDANI e ROSSI, 2009).

No nível extraintestinal, o butirato tem efeitos benéficos em hemoglobinopatias como a doença falciforme e talassemia beta, por aumentar os níveis de produção de hemoglobina fetal, principalmente através da inibição da enzima histona deacetilase, causando efeito global de hiperacetilação de histonas e conseqüentemente aumentando a expressão do gene da γ -globina (CANANI *et al.*, 2012).

Os AGCC produzidos pelas bactérias intestinais também interferem no metabolismo energético do hospedeiro, contribuindo com cerca de 10% da sua demanda energética (FLINT *et al.*, 2012). Fato importante para pessoas com DF, pois elas apresentam

metabolismo bastante elevado, requerendo maior demanda de energia. Isto acontece principalmente devido a hemólise crônica e a vaso-oclusão, o que provoca maior necessidade metabólica. Como resultado, as crianças com DF apresentam atraso no crescimento e, conseqüentemente, baixo peso devido à baixa reserva energética (BARDEN *et al.*, 2002).

Alguns estudos evidenciaram que grupos de indivíduos que receberam a mesma quantidade de glicose por via enteral e por via oral diferiram nos níveis do peptídeo C, usado como parâmetro para avaliar os níveis de insulina. Assim, foi identificado que células L presentes no ílio e no cólon, pertencentes ao grupo das células enteroendócrinas, são estimuladas pelos AGCC a produzirem incretinas como o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1). O GLP-1 diminui a apoptose e aumenta a proliferação das células beta-pancreáticas produtoras de insulina, aumenta a síntese desse hormônio 75%, diminui a síntese do glucagon, age no centro da saciedade diminuindo a fome e exerce efeito cardioprotetor (PERLEY e KIPNIS, 1967; DRUCKER, 2006; BAGGIO e DRUCKER, 2007).

1.1.3- Microbiota

A microbiota intestinal caracteriza-se pelo conjunto de microrganismos residentes no trato gastrointestinal do indivíduo e que mantem relação simbiótica e desempenham importantes funções para a fisiologia do seu hospedeiro. Tais microrganismos, quando de caráter transitório, são denominados de alóctones, e quando de caráter permanente são autóctones (GUARNER, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010). As bactérias são ainda classificadas como comensais, quando possuem uma relação simbiótica, ou patogênicas, quando causam prejuízos para o seu hospedeiro. Dessa forma, são denominados de disbioses, os quadros onde há predominância de bactérias patogênicas sobre as comensais (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Acreditava-se que ao nascer, o intestino do feto é estéril, sendo iniciado o processo de colonização por microrganismos durante e após o parto. Porém, alguns estudos recentes sinalizam para a presença de algumas poucas espécies de microrganismos transmitidas via placenta (SATOKARI *et al.*, 2009; JIMÉNEZ *et al.*, 2008).

A distribuição da microbiota é heterogênea ao longo do trato gastrointestinal, no estômago (10^3 UFC/mL) e intestino delgado (10^4 UFC/mL) o número é bastante limitado, em função da ação bactericida do ácido clorídrico, sais biliares, secreção pancreática e expulsão pelo peristaltismo. Na região final do intestino delgado, íleo (10^7 UFC/mL), e no intestino grosso (10^{12} UFC/mL) há um significativo aumento quantitativo e qualitativo desses microrganismos (GUARNER, 2007; TURRONI *et al.*, 2008), tendo como fatores determinantes para definir seu perfil: o tipo do parto, amamentação natural ou artificial,

fatores genéticos, composição alimentar e uso de drogas, principalmente antimicrobianos (PENNA e NICOLI, 2001; BRANDT *et al.*, 2006). Após a instalação da microbiota definitiva por volta de 18 a 24 meses, ela mantém-se estável ao longo da vida do hospedeiro (GUARNER e MALAGELADA JR., 2003).

Crianças nascidas de parto vaginal iniciam a formação de sua microbiota através de microrganismos maternos presentes no canal do parto. No entanto, as de parto cesáreo iniciam essa colonização através de outros microrganismos presentes no ambiente, principalmente o hospitalar. Estudos mostram que indivíduos nascidos de parto vaginal apresentam maior percentual *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em sua microbiota intestinal, quando comparado a crianças que nasceram de parto cesáreo (ANDRADE, 2010).

O leite materno influencia na formação da microbiota intestinal, pois além de possuir IgA, capaz de limitar a presença de determinados grupos de microrganismos, contém o fator bífido, um oligossacarídeo, somente presente em quantidade elevada no leite humano, e conhecido por facilitar o crescimento de grupos de microrganismos denominados de bifidobactérias. Cerca de 90% da composição da microbiota intestinal de crianças amamentadas exclusivamente de leite materno é formada por *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (HARMSE *et al.*, 2000).

Os microrganismos que compõem a microbiota intestinal precisam aderir-se a receptores presentes nas células intestinais, para não serem arrastadas pelo peristaltismo. O padrão genético influencia na expressão de receptores de adesão bacteriana, presentes na superfície do lúmen do TGI, o que proporciona adesão de certos grupos e não de outros (BARBOSA *et al.*, 2010). Gêmeos univitelinos, mesmo separados, mantêm uma composição semelhante, quando comparados com gêmeos bivitelinos, o que sinaliza a importância do padrão genético na determinação da microbiota permanente (BRANDT *et al.*, 2006; ANDRADE, 2010). O padrão de expressão dos receptores de adesão reduz com o avançar da idade, diminuindo a diversidade das bactérias comensais e instalando bactérias patogênicas. Isso tem como consequente a instalação das disbioses, características dos idosos e que são responsáveis pelos quadros de diarreia (UDALL, 1981)

No bolo fecal, encontram-se diversos microrganismos como vírus, fungos, protozoários, no entanto em torno de 50% da sua massa é composta por bactérias, havendo cerca de 10^{14} bactérias aderidas a superfície intestinal, o que corresponde a 1,2 kg da massa corporal (BARBOSA *et al.*, 2010). Análise metagenômica da microbiota de fezes humanas mostra que a maioria das sequências são de origem bacteriana, com 0,14% das *reads* classificadas como contaminação humana, 0,5% de todos os outros eucariotos, 0,8% de arqueia e 5,8% de vírus (ARUMUGAM, 2011; SCHOLTENS, 2012).

Aproximadamente 97% das espécies bacterianas presentes na microbiota intestinal são anaeróbias e 3% são anaeróbias facultativas. Eckburg (2005) apresenta os filós

Firmicutes e Bacteroidetes como os principais componentes da microbiota humana, e que um número substancial que compõe o primeiro grupo são bactérias conhecidas como produtoras de butirato. O principal gênero bacteriano é *Bacteroides*, mas *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, família Enterobacteriaceae, *Streptococcus* e *Clostridium* também estão presentes. No entanto a microbiota intestinal saudável é considerada quando possui uma grande participação de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.

A microbiota do TGI alberga cerca de 30 gêneros e mais de 1000 espécies de bactérias (SCHOLTENS *et al.*, 2012). Arumugam *et al.* (2011) analisaram 22 metagenomas de microbiota fecal de seres humanos de quatro nacionalidades, juntamente com dados de sequenciamento previamente publicados e identificaram três gêneros taxonômicos que são comuns a todas as amostras e, portanto, não sendo nacional ou específico do continente. Confirmaram também, através da composição filogenética das sequências avaliadas, que os filos Firmicutes e Bacteroidetes compõem a grande maioria da microbiota intestinal humana e que o gênero *Bacteroides* foi o mais abundante, porém o mais variável entre as amostras.

De acordo com Arumugam *et al.* (2011), normalmente os grupos mais abundantes estão também relacionados com as funções mais representativas da comunidade, apesar que grupos pouco abundantes possam desempenhar funções importantes. O bom exemplo é o filo Firmicutes que desempenha um papel relevante na conversão de acetato em butirato (NEPELSKA *et al.*, 2012).

Arumugam *et al.* (2011) também identificaram que três gêneros taxonômicos desempenhavam função de núcleo principal, mantendo fortes relações com outros gêneros (coexistindo ou se evitando) dentro dessa comunidade. Esses grupos eles denominaram de enterotipo 1 (*Bacteroides*), enterotipo 2 (*Prevotella*) e enterotipo 3 (*Ruminococcus*) (Fig. 3).

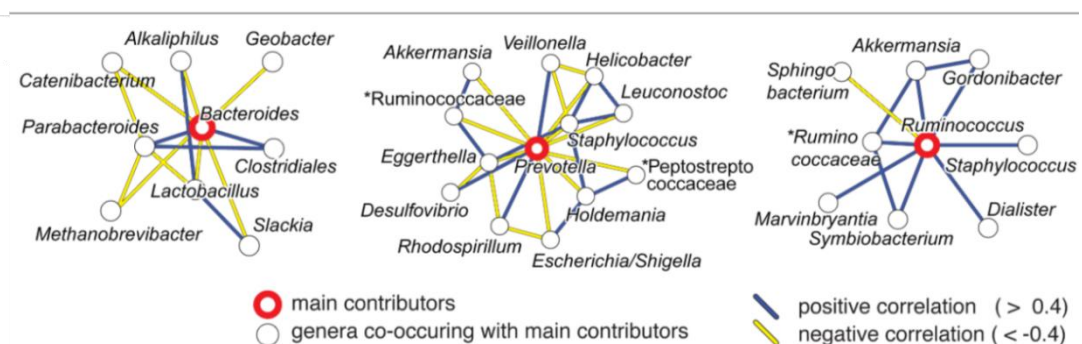


Figura 03- Redes de co-ocorrência dos três enterotipos. Fonte: Arumugam *et al.* (2011).

1.1.3.1- Relação da microbiota com a permeabilidade intestinal

A disbiose intestinal é responsável por uma série de alterações metabólicas sistêmicas, devido ao aumento da permeabilidade do TGI. Esse aumento de permeabilidade ocorre pelo comprometimento da expressão de proteínas de adesão entre os enterócitos, como as claudinas e ocludinas, ou através da diminuição da produção de mucina intestinal. Com diminuição dos fatores de adesão e da mucina, moléculas antigênicas como os LPS são absorvidas para a circulação sistêmica (DENIPOTE, 2010).

Os LPS são endotoxinas presentes na membrana externas das bactérias Gram-negativo e são liberadas principalmente quando da morte dessa célula ou da sua divisão, é considerado como principal fator de virulência nas infecções por bactérias Gram-negativo e nas inflamações sistêmicas. Estima-se que em função da colonização intestinal ter importante parcela dessas bactérias, exista cerca de 1 mg de LPS por grama de fezes. Essas moléculas são responsáveis por desencadear o processo inflamatório e febril, quando em altas concentrações, no entanto, em concentrações mais baixas são responsáveis pela resposta imunomoduladora ou por causar um estado de inflamação subclínica (RIETSCHER *et al.*, 1994; TUIN *et al.*, 2006).

1.1.3.2- Relação da microbiota com sistema imune

A barreira imunológica exercida pelo TGI apresenta aspectos extracelulares tais como lisozimas presentes na saliva, baixo pH estomacal devido ao HCl, presença de sais biliares, muco, enzimas e imunoglobulinas como a IgA, e aspectos celulares como adesão entre os enterócitos devido as junções firmes e a presença do GALT. Essas condições do lúmen intestinal garantem a destruição de microrganismos patogênicos bem como a não absorção de moléculas antigênicas. Porém, muitas dessas funções dependem do estabelecimento da microbiota (STILLING, 2016).

A presença de uma microbiota reconhecidamente saudável proporciona os seguintes benefícios ao sistema imune do seu hospedeiro: ao aderir-se a membrana apical do enterócito, através de receptores específicos, cria uma barreira mecânica contra microrganismos patogênicos; estimula o desenvolvimento do Tecido Linfóide Associado ao Intestino; compete por nutrientes; produz metabólitos como o ácido láctico que diminui o pH do lúmen intestinal deixando o ambiente inóspito para certos patógenos; e produz proteínas metabolicamente ativas, com efeito bactericida, denominadas de bacteriocinas, sendo a reuterina, uma importante bacteriocina, produzidas por *Lactobacillus reuteri* (SILVA *et al.*, 2016; DINLEYICI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2010).

A presença da microbiota intestinal é fundamental para o processo de migração de macrófagos e neutrófilos para o TGI, essas células compõem o sistema imune inato. Nosso sistema imune inato ou natural caracteriza-se como primeira linha de defesa contra infecções por microrganismos. Esta resposta inicial inespecífica é fundamental para ativação da resposta humoral (anticorpos) e celular (linfocitária) que compõem o sistema imune adaptativo (ANDRADE, 2010; BRANDT *et al.*, 2006).

As células do sistema imune inato apresentam Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR), capazes de identificar padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), assim como padrões moleculares associados ao dano (DAMP), este último de origem endógena, fruto de estresse e lesão celular (como nos traumas e quadros isquêmicos), o seu reconhecimento é fundamental nas respostas inflamatórias tipo estéril não infecciosas. Os PRR podem apresentar localização na membrana plasmática, como os *Toll-Like Receptor* (TLR) ou citoplasmática como os *Nod Like Receptor* (NLR). Os TLRs e os NLRs são os principais receptores de reconhecimento dos PAMPs, enquanto os DAMPs são reconhecidos apenas pelos receptores de membrana do tipo *Toll*. A ativação desses receptores desencadeia a expressão de uma série de genes e mediadores pró-inflamatórios (CRUZ-MACHADO, 2010; LU, 2008; KAWAI e AKIRA, 2006).

Os receptores NLR são sensores citoplasmáticos que quando estimulados pelo LPS se oligomerizam, formando um complexo proteico denominado de inflamassoma, essa plataforma de proteína é responsável pela síntese de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β e interleucina 18 (DAVIS *et al.*, 2011; STROWIG *et al.*, 2012). A ativação dos receptores NLR, e, portanto, manutenção do inflamassoma, é responsável pela quebra da homeostase e a instalação de um estado crônico inflamatório com desenvolvimentos de várias doenças (HENAO-MEJIA, *et al.*, 2012).

Compondo o complexo proteico inflamassoma, além do NLR ativo e de proteínas adaptadoras como ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD-caspase activation and recruitment domains*) existe a enzima Caspase 1, que ao ser ativada com a montagem da plataforma, passa a clivar a pro-interleucina 1 β (pro-IL-1 β) e a pro-interleucina 18 (pro-IL-18) em interleucinas 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18), respectivamente. Essas interleucinas apresentam atividade pleiotrópica com efeitos fisiopatológicos em diversas células (BRADDOCK e QUINN, 2004; HANAMSAGAR, *et al.*, 2012; PAIVA-OLIVEIRA, 2012).

A IL-1 β aumenta a expressão de moléculas de adesão, tonifica a coagulação sanguínea, ativa células endoteliais, induz a COX-2, aumenta a produção de citocinas como TNF- α (esse pode induzir a endocitose de ocludinas) e interleucina-6 (IL-6), possui atividade pirogênica, promove liberação de neutrófilos da medula, ativa macrófagos e linfócitos T e interfere na saciedade, na temperatura e no sono. A IL-18 aumenta adesão de moléculas de

superfície, induz o ligante Fas, estimula a proliferação de células T ativas, aumenta o fator de crescimento de macrófagos, induz a resposta alérgica, aumenta a toxicidade de células Natural Killer (NK) e induz a produção de interferon gama (IFN- γ), envolvido na regulação das junções firmes no TGI (DINARELLO, 2006; PAIVA-OLIVEIRA, 2012; RODRIGUES, 2016).

Já o principal receptor de reconhecimento dos LPS na membrana é TLR-4, e seu principal mecanismo de ação está relacionado com ativação do Fator Nuclear kappa B (NF κ B) citoplasmático, que então se desloca ao núcleo e age como fator de transcrição para mais de 200 genes envolvidos com a resposta fisiopatológica, como moléculas de adesão celular (PECAM e ICAM), citocinas pró-inflamatórias (interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e as enzimas ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (CRUZ-MACHADO, 2010).

O reconhecimento do LPS pelo TLR-4 envolve a participação de outras moléculas como a LBP-proteína ligante de LPS, a proteína CD14 e ainda a proteína mieloide diferenciadora 2 (MD-2). Essas proteínas auxiliam a transferência do LPS para o TLR-4, que por sua vez desencadeia o processo de sinalização intracelular com o recrutamento de proteínas que convergem para a fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossômica da proteína inibidora do NF κ B, a I κ B-alfa (Fig 4) (CRUZ-MACHADO, 2010; KAWAI e AKIRA, 2006).

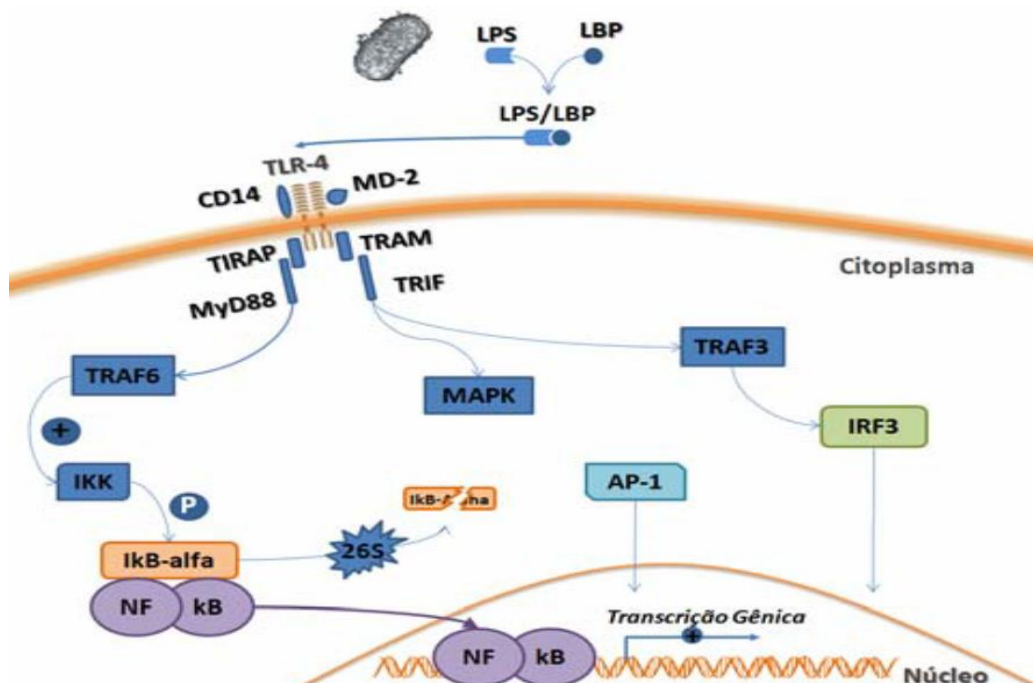


Figura 04- Sinalização envolvendo LPS/TLR na ativação do fator de transcrição NF κ B. LPS- Lipopolissacarídeo; TLR -Toll Like Receptor; LBP- Lipopolysaccharide Binding Protein; Proteína CD14; MD-2-proteína mieloide diferenciadora 2; NF κ B-Fator Nuclear kappa B; I κ B-alfa- proteína inibidora do NF κ B; MAPK- mitogen-activated protein kinase; AP-1-activator protein 1; IRF3- interferon-regulatory factor 3 . Fonte: (CRUZ-MACHADO, 2010)

Sendo assim, a resposta de inflamação é um mecanismo de defesa emergencial a estímulos causados por PAMPs e DAMPs e de caráter essencial para a sobrevivência do organismo, porém em situações inapropriadas ou exacerbadas, ao invés de proteção pode ser a causa de reações patológicas adversas como destruição de órgãos, alergias e em situações extremas o choque séptico, associado com alta taxa de mortalidade. Segundo Cinel e Opal (2009), nesse último caso, a presença de microrganismos ativa o inflamassoma e induz uma elevada produção de IL-1 β instalando uma inflamação generalizada com coagulação intravascular disseminada, hipoglicemia e falência vascular (RIETSCHEL e col., 1994; GUHA e MACKMAN, 2001). Essa elevação da IL-1 β , além de estar relacionada ao choque séptico, mantém relação com a fisiopatologia da hiperalgesia, fazendo do inflamassoma e dos receptores da IL-1 β importantes alvos de abordagens terapêuticas (SCHOLZ e WOOLF, 2007).

O controle da IL-1 β ocorre através de feedback negativo, envolvendo o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, onde a IL-1 β estimula o hipotálamo a liberar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que age na hipófise anterior para liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez estimula a zona fascicular do córtex da adrenal a liberar glicocorticosteroides que inibem a síntese da proIL-1 β (VARELLA e FORTE, 2001).

1.1.3.3- Produção de vitaminas e neurotransmissores pela microbiota intestinal

Além de proteção imunológica e do controle da permeabilidade intestinal, com consequente diminuição da resposta inflamatória sistêmica, a microbiota é responsável pela produção de vitamina K e do complexo B, importantes para processos de coagulação sanguínea, metabolismo energético, hematopoese e absorção de nutrientes. As principais bactérias produtoras de vitamina K e do complexo B são *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterobacterium* e *Veillonella* (ALBERT *et al.*, 1980; CONLY *et al.*, 1994; BARBOSA *et al.*, 2010).

Vitaminas do complexo B como a B1 (Tiamina) estão envolvidas com a formação da Acetil-CoA, e, portanto, com início do ciclo de Krebs. Tecidos com alta demanda energética como o nervoso e muscular são bastante afetados com a diminuição dessa vitamina. A vitamina B6 (Biotina) é importante para atividade da enzima Aminoácido Aromático Descarboxilase (AADC) responsável em converter DOPA em dopamina e o 5-hidroxitriptofano em serotonina. Essa vitamina também é importante para enzima Descarboxilase do Ácido Glutâmico (GAD) que converte o glutamato em GABA, principal

neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (LEHNINGER, 2002; GUYTON e HALL, 2011).

Portanto, a microbiota intestinal exerce considerável relevância na síntese de diversos neurotransmissores. A serotonina por exemplo é fundamental para o processo de peristaltismo intestinal e juntamente com outros neurotransmissores e mediadores da inflamação estabelecem importante elo entre as disbioses intestinais e o aumento da sensibilidade visceral, pois, a ativação crônica dos nociceptores, devido a esses mediadores, pode causar episódios imprevisíveis de hiperalgesia desproporcional ao estímulo. Estudos tem demonstrado que uso de antibióticos está relacionado com o aumento da sensibilidade visceral na idade adulta devido a sua interferência da composição da microbiota intestinal (WIDGEROW, 2012; PUSCEDDU, 2018).

Estudos mostram que as disbioses intestinais são responsáveis por quadros de hiperserotonemia e comprometimento nos níveis de triptofano plasmático, pois as células enterocromafins do intestino, responsáveis em produzir a serotonina, são estimuladas por AGCC e aumentam a permeabilidade do intestino, permitindo que maiores níveis de serotonina chegue à corrente sanguínea (THEIJE *et al*, 2011).

A serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor responsável por funções como estado de humor, memória e aprendizagem em nível de SNC, já no nível periférico é responsável pela ativação plaquetária, vasoconstrição e vasodilatação, bronquioconstrição, aumento da sensibilidade visceral, motilidade e secreção gástrica (CARABOTTI, 2015). Esta é sintetizada a partir do triptofano e cerca de 90 a 95% do aminoácido são usados localmente pelo intestino para produção da sua 5-HT. Logo, apenas 5 a 10% do triptofano é lançado na corrente sanguínea e após atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) será metabolizado em 5-HT, já que a BHE não é permeável a serotonina plasmática. Parte dessa serotonina circulante será capturada e armazenada nos grânulos plaquetários, pois as plaquetas não apresentam vias metabólicas capazes de sintetizar sua própria serotonina (O'MAHONY *et al.*, 2015).

1.1.3.4- Hipótese da Higiene

A diminuição do contato das crianças com microrganismos do ambiente, seja por uso de antibióticos ou outros fatores limitantes, diminui a pressão de contato. Isso ficou conhecido como “Hipótese da Higiene” e deve-se a mudanças nos padrões de higienização na produção e manipulação de alimentos, uso de vacinas e antimicrobianos, redução no número de filhos, mudanças nos padrões socioculturais e econômicos (ALM *et al.*, 1999; ALM *et al.*, 2002; DENIPOTE, 2010).

O comprometimento do estabelecimento da microbiota intestinal gera alteração no desenvolvimento do sistema nervoso central, com surgimento de ansiedade, depressão, autismo e outros distúrbios psiquiátricos. Além de alterar o padrão da resposta imune, com crescente número de Enterocolite Necrosante (EN), Doença Inflamatória Intestinal (DII) e doenças atópicas (GUARNER, 2007; RUPPER e ANDREMONT, 2013).

Estudos com animais mostram também que alterações da microbiota nas fases iniciais do desenvolvimento dos indivíduos podem causar sequelas permanentes. Carabotti *et al.*, (2015) usando modelos de ratos isentos de germes mostrou que os animais apresentavam respostas exacerbadas frente a situações de estresse e que tal resposta se normalizava após serem colonizados com uma microbiota intestinal normal. Ele mostrou também que essa recuperação da resposta ao estresse só ocorria se a colonização do intestino fosse em fases iniciais do desenvolvimento e, portanto, depois de certa idade não era mais possível reverter esse padrão exacerbado de resposta ao estresse, evidenciando a existência de uma relação entre os níveis de cortisol e a microbiota (CARABOTTI *et al.*, 2015; BOKULICH *et al.*, 2016).

1.1.3.5- Mecanismos de interferência positiva na microbiota intestinal

Uma alternativa de alterações positivas para a recomposição da microbiota intestinal saudável é o uso de probióticos, prebióticos e simbióticos. De acordo a Organização Mundial de Saúde (OMS), probióticos constituem microrganismos vivos, que fornecidos em quantidades adequadas são capazes de trazer benefícios à saúde do seu hospedeiro, através de modificações na sua microbiota. Prebióticos são substâncias que não são digeridas, nem absorvidas no intestino delgado e que facilitam o desenvolvimento da microbiota e/ou de probióticos. Os simbióticos são alimentos que contém a junção de prebióticos e probióticos (SAAD, 2006; WALL *et al.*, 2009).

Os probióticos, além de possuírem mecanismos de ação semelhante aos microrganismos autóctones que compõem a microbiota intestinal, inibem bactérias que convertem produtos pré-carcinogênicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas) em substâncias carcinogênicas, e diminuem as enzimas β -glucuronidase e nitroredutase, produzidas por bactérias patogênicas, com consequentemente diminuição de substâncias nocivas (DENIPOTE, 2010). O probiótico *Lactobacillus reuteri*, além de produzir a reuterina (proteína com atividade bactericida), tem a capacidade de suprimir a atividade do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que está relacionado com o comprometimento das junções firmes e consequente aumento da permeabilidade intestinal (SILVA, 2016; DINLEYICI, 2015; SILVA, 2010).

Os probióticos juntamente com a microbiota intestinal podem degradar o ácido fítico, um dos mais importantes fatores antinutricionais, presente nos alimentos de origem vegetal, principalmente nas sementes. O ácido fítico é um potente quelante de Ferro, Zinco, Magnésio e Cálcio e conseqüentemente pode desencadear anemia ferropriva, diminuição da resposta antioxidante e diminuição da mineralização óssea (RAGHAVENDRA, 2009; BENEVIDES *et al.*, 2011). Trabalho realizado com fórmulas nutricionais distribuídas em Belo Horizonte, os índices do ácido fítico era 20 vezes maior do que o limite permitido (NAPPI *et al.*, 2006)

Os principais gêneros de bactérias probióticas são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, representados pelas espécies *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (SANTOS *et al.*, 2011; RAIZEL *et al.*, 2011; BERDANI e ROSSI, 2009; MORAIS e JACOB, 2006; SAAD, 2006).

Como exemplo de prebióticos temos a inulina, lactiol, lactulose, xilitol e alguns oligossacarídeos como o frutooligossacarídeo (FOS). Tais nutrientes são encontrados em alimentos como alho, cebola, banana, cereais, beterraba, trigo, chicória, aspargo e alcachofra, sendo a inulina e a FOS as fibras prebióticas de maior importância (CARRENHO, 2014; RAIZEL *et al.*, 2011).

Os prebióticos podem aumentar a absorção de sais inorgânicos (Cálcio, Ferro, Zinco, Cobre, Magnésio) através da diminuição do pH e do aumento da área de absorção intestinal, pois, em condições de alcalinidade intestinal esses sais inorgânicos são insolúveis e, portanto, menos absorvíveis. Com a degradação dos prebióticos pelos probióticos ou pela microbiota intestinal há a formação AGCC, ácido acético, butílico, e propiônico que diminuem o pH do lúmen e solubilizam esses sais, facilitando sua absorção (MACHADO, *et al.*, 2001). Além disso, a entrada do butirato e do lactato para o interior das células intestinais ocorre através de receptores associados com proteínas G, GPR41 e GPR43, e induz a proliferação de enterócitos e colonócitos com conseqüente aumento da superfície de absorção do intestinal (FROTA, 2015).

Ratos alimentados com os prebióticos inulina ou arabinosilanos aumentaram significativamente a produção de mucina, que foi acompanhada pelo aumento de *Akkermansia muciniphila*. Essa bactéria intestinal foi isolada em 2004, é uma Gram-negativo, anaeróbia estrita, degradadora de mucina pertencente ao filo *Verrucomicrobia*. Está presente na maioria dos indivíduos testados, apresenta-se como um verdadeiro simbionte de seres humanos, compondo cerca de 1 a 4% das bactérias colônicas. O gênero *Akkermansia* é considerado da microbiota indígena do intestino, devido a sua presença em imensa gama de espécies animais, domésticas e selvagens, e evolutivamente distantes. Sua capacidade de degradar mucina oferece vantagens competitivas de sobrevivência em

momentos de jejuns prolongados ou em dietas parenterais (SHEN *et al.* 2016; DERRIEN *et al.*, 2017; BELZER e DE VOS, 2012). Segundo Arumugam *et al* (2011), devido as pressão seletiva do hospedeiro e de outros microrganismos sobre a microbiota intestinal, determinados grupos são mais abundantes do que outros, e as funções moleculares identificadas como mais relevantes, geralmente ligadas aos grupos mais representativos.

Além dos probióticos e prebióticos como alternativa no tratamento das disbioses, os Transplantes de Microbiota Fecal (TMF) vem ganhando notoriedade, devido aos excelentes resultados. O TMF consiste numa metodologia, que através de comprimidos, sondas nasogástricas ou colonoscopia, são introduzidas bactérias comensais de pacientes saudáveis em indivíduos com microbiota considerada não saudável, porém a técnica ainda precisa de mais estudos (ZHANG *et al.*, 2020; SATOKARI, *et al*, 2014; SINGH, *et al.*, 2014; KAPEL, *et al.*, 2014).

1.1.3.6- Mecanismos de interferência negativa na microbiota intestinal

Entre os fatores externos limitantes na composição da microbiota intestinal pode-se citar a pressão dos microrganismos presentes no ambiente, a disponibilidade e competição por nutrientes ingeridos pelo hospedeiro e a exposição a determinados grupos de drogas, tendo os antimicrobianos como o mais importante fator externo de interferência na composição da microbiota intestinal (ANDRADE, 2010). Portanto, drogas, laxantes, antiácidos, antibióticos, além de causar disbiose, são responsáveis por aumentar a pressão de seleção das bactérias e facilitar o processo de resistência, principalmente quando o uso é feito de forma inadequada e prolongada (JERNBERG *et al*, 2010; CARLET, 2012)

Assim, doenças como anemia falciforme, que apresenta imunodepressão e uso de antibioticoprofilaxia crônica, principalmente nos dois primeiros anos de vida, podem ter complicações desconhecidas devido ao uso desses antimicrobianos.

1.2- Doença Falciforme

A anemia falciforme é a doença genética monogênica mais prevalente no Brasil e no mundo, decorrente de um polimorfismo de um único nucleotídeo com substituição de uma Adenina por uma Timina no sexto códon da cadeia beta da hemoglobina, causando uma mudança na sequência de seus aminoácidos, onde um glutamato é trocado por uma valina (BRASIL-MS, 2018).

A hemoglobina mutante é denominada de HbS, enquanto a hemoglobina normal é chamada de HbA. Indivíduos heterozigotos para tais hemoglobinas são conhecidos como traço falciforme e são clinicamente normais enquanto os homozigotos para HbS são afetados

pela anemia falciforme. Dentro do grupo da hemoglobinopatias, além da anemia falciforme, existem outras doenças falciformes, que são caracterizadas por um aspecto clínico mais brando e causadas pela heterozigose da HbS com outras hemoglobinas mutantes como a HbC (BRASIL-MS, 2018).

Essas mutações causam polimerização das moléculas de hemoglobina mutante quando em situações de estresse fisiológico como infecções, baixa pressão de oxigênio e desidratação, com consequentes alterações morfológicas dos eritrócitos que adquirem forma de foice. As falcizações geram crises vaso-oclusivas e hemólise. Assim, essa doença é marcada por constantes necroses isquêmicas nos mais diversos órgãos, causando dactilite, Acidente Vascular Encefálico (AVE), dores torácicas, sequestro esplênico, priapismo, úlceras de perna, necrose da cabeça do fêmur e infarto do baço, com evolução para uma asplenia funcional e posterior auto-esplenectomia que compromete a imunidade dos pacientes (MANFREDINI, 2007; BRASIL-MS, 2009; BRASIL-MS, 2012; DIAS *et al.*, 2013)

Estudos recentes mostram que a simples falcização do eritrócito não seja a questão central na crise vaso-oclusiva, pois fatores de adesão presentes nas membranas dos eritrócitos falcizados e nas células endoteliais, juntamente com neutrófilos senescentes e mediadores inflamatórios, desempenham importante papel nesse processo. Os neutrófilos envelhecidos são o gatilho principal, pois os eritrócitos falcizados em vez de se ligarem ao endotélio, aderem-se mais comumente a essas células, gerando um nódulo que culminará com a vasclusão. Desta forma, a crise vaso-oclusiva é consequência da interação entre eritrócitos falcizados, citocinas inflamatórias, endotélio e neutrófilos ativados, sendo esses últimos, os atores centrais (MANFREDINI, 2007; BRASIL-MS, 2009; BRASIL-MS, 2012; DIAS *et al.*, 2013; LIM *et al.*, 2016).

Na patogênese da DF, um outro fator relevante está associado ao envelhecimento precoce do eritrócito devido as constantes falcizações, o que gera hemólise com liberação de padrões moleculares associados ao danos (DAMPs) e depressão do óxido nítrico (NO), um potente e importante vasodilatador. A diminuição do NO ocorre por dois mecanismos principais relacionados com a ruptura do eritrócito e consequente liberação da hemoglobina e da arginase na circulação. A hemoglobina reage com o NO e se transforma em metahemoglobina e a arginase quebra a arginina que é precursora do NO. Essa diminuição do NO contribui ainda mais com a vasclusão e o comprometimento imunológico (KIM-SHAPIRO *et al.*, 2018).

No Brasil, a anemia falciforme apresenta uma incidência de 1 caso para 1000 nascimentos e a Bahia é o estado com maior ocorrência, com um 1 caso para cada 650 nascimentos. Estima-se que somente neste estado existam 328 novos casos ao ano, pois, a média anual de nascimentos na Bahia é de aproximadamente 213 mil nascidos vivos (ALMEIDA, 2006; SESAB, 2016).

Desta maneira, as Doenças Falciformes caracterizam-se como um importante problema de saúde pública, com elevada morbimortalidade, tendo as crises vaso-oclusivas - CVO, queda da imunidade e o estado de inflamação crônica, os grandes responsáveis pela baixa expectativa de vida desses pacientes (NUZZO *et al.*, 2004; AMORIM, 2010; FERNANDES *et al.*, 2010). Segundo Fernandes *et al.* (2010) a maior parte dos óbitos está relacionada a septicemia e sequestros esplênicos. Na tentativa de amenizar essas complicações, o Ministério da Saúde indica o uso de antibioticoprofilaxia nos pacientes com DF do diagnóstico aos cinco anos de idade (BRASIL-MS, 2018).

No entanto, os dois primeiros anos de vida é o período que coincide com o de maior instabilidade e vulnerabilidade no desenvolvimento da microbiota intestinal, pois, é a partir do segundo ano de vida que ela atinge o seu clímax de desenvolvimento, se aproximando de uma composição semelhante de um adulto e se mantendo ao longo de toda a vida (GUARNER e MALAGELADA JR., 2003). O uso de antibióticos nessa fase crucial pode causar marcas permanentes na composição da comunidade bacteriana do intestino, pois após atingir o seu desenvolvimento a partir de 24 meses de idade, mesmo que haja brusca mudança na dieta ou uso de antibióticos, a microbiota que já atingiu seu clímax de desenvolvimento é capaz de se recompor, desde que as condições normais retornem (JERNBERG *et al.*, 2010; MODI *et al.*, 2014; FRÖHLICH e FARZI, 2016).

Assim, apesar da comprovada eficácia da antibioticoprofilaxia em pacientes com DF, diversos autores relatam que o uso dos antibióticos é o principal fator comprometedor da microbiota intestinal e que as disbioses causadas por antibióticos são responsáveis por alterações sistêmicas devido ao aumento da permeabilidade intestinal, diminuição de barreira imunológica, alterações neuroendócrinas, comprometimento na síntese de vitaminas e no metabolismo enzimático (SCHUMANN, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2009; JERNBERG *et al.* 2010; MODI *et al.*, 2014; FRÖHLICH e FARZI, 2016).

1.2.1- Terapia da Doença Falciforme

A terapia das DF consiste em estimular a hematopoese com uso de ácido fólico, evitar vasoconstrições acentuadas com uso de compressas quentes e hidroxureia (HU) que eleva o NO, reduzir a falcização com transfusões sanguíneas e com elevação da hemoglobina fetal pela HU, evitar infecções com vacinas e antibioticoprofilaxia, além de outras orientações terapêuticas como ingestão abundante de água e uso de analgésicos (RODGERS, 1997; CANÇADO *et al.*, 2009; BRASIL-MS, 2012).

Mesmo com tal aporte terapêutico, as doenças falciformes ainda apresentam alta morbimortalidade, que resultam na redução de 25 a 30 anos da expectativa de vida, em comparação com a população geral sem DF (BRASIL-MS, 2018). Pois, essa doença é

marcada principalmente pelo comprometimento do sistema imunológico devido a dois mecanismos: sua ineficiência no combate a microrganismos e/ou por acentuar o processo vaso-oclusivo através de mediadores pro-inflamatórios (PLATT *et al.*, 1994; DAYANA *et al.*, 2004; ARAUJO, 2015).

Portanto, tendo em vista as considerações acerca da anemia falciforme e que o uso de antimicrobianos é um dos mais importante fatores de alteração da diversidade da microbiota intestinal, e que os probióticos e prebióticos são alternativas terapêuticas acessíveis e baratas, fazem-se necessários estudos que possam mostrar os principais grupos toxonômicos com suas respectivas características funcionais, bem como, quais os impactos sistêmicos dessas possíveis disbioses em pacientes com DF, com a finalidade de fornecer informações que possibilitem ampliar as estratégias terapêuticas existentes e assim evitar complicações causadas por interferências na microflora de pacientes com doença falciforme.

1.3- Diagnóstico de disbioses e funcionamento intestinal

Uma das formas de se avaliar a saúde do intestino, com uma abordagem um pouco mais clínica, é através da análise de sua permeabilidade, pois essa reflete o principal elo entre a interação da microbiota, dieta e células intestinais e as manifestações sistêmicas causada pela quebra dessa relação. Existem diversas técnicas, invasivas e não invasivas, para avaliar essa permeabilidade. Entre as invasivas, a medição das concentrações de lipopolissacarídeo circulante (LPS), proteína de ligação a LPS (LBP) e proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (iFABP) é utilizada para o cálculo de um escore de risco de permeabilidade (PRS) (COX *et al.*, 2017). As técnicas não invasivas consistem no fornecimento de marcadores moleculares não absorvíveis, como o teste de absorção dupla de açúcar, com a administração oral de mono e dissacarídeos (WANG *et al.*, 2015; DORSHOW *et al.*, 2017).

Uma outra forma de avaliar a funcionalidade intestinal é através da análise da sua microbiota. No entanto, em função de limitações de mimetizarmos em laboratório as condições exatas de nutrientes, pH e interações entre os microrganismos ali existentes, menos de 20% destes microrganismos são cultiváveis pelas técnicas tradicionais de cultivo. Sendo assim, a inferência da diversidade de microrganismos é dada de forma indireta, através de ferramentas da biologia molecular e de bioinformática, onde o DNA total da amostra é extraído, processado, amplificado, sequenciado e com o uso de programas computacionais e bancos de dados é identificado e construído suas relações filogenéticas. Porém, há certa complexidade na determinação do perfil saudável da microbiota intestinal em função de protocolos de amostragem, da manipulação dos ácidos nucleicos, do

processamento, do sequenciamento e das análises computacionais, assim como pela diversidade de condições fisiológicas, nutricionais e ambientais que o indivíduo se encontra (TREMBLAY *et al.*, 2015; KEBSCHULL *et al.*, 2015; GOHL *et al.*, 2016).

1.3.1- Gene 16S ribossômico - 16S rRNA

Uma das principais técnicas moleculares para identificação de microrganismos recalcitrantes aos métodos de cultivo é através do gene 16S rRNA. Evolutivamente, é altamente conservado, pois foi pouco afetado por transferências horizontais de genes. Além de ser o gene mais utilizado para inferência taxonômica e análise filogenética, compõe um dos maiores bancos de dados de sequências de DNA. Apresenta aproximadamente 1650 pb, com nove regiões hipervariáveis (V1-V9) intercaladas por regiões conservadas, as quais permitem a construção de iniciadores universais. As regiões hipervariáveis V3-V4 são as mais utilizadas para identificar comunidades bacterianas no nível de gênero e possivelmente de espécie (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998; YANG *et al.* 2016; SINGER *et al.*, 2016).

O método consiste na amplificação da região de interesse com oligonucleotídeos iniciadores específicos como o 341Forward e 806Reverse (que apresentam alta cobertura para Archaea e Bacteria) e os amplicons gerados de aproximadamente 465 pb são utilizados no preparo de bibliotecas que posteriormente serão sequenciadas (CAPORASO *et al.*, 2011; TAKAHASHI *et al.*, 2014). Atualmente, o sequenciamento desses fragmentos é realizado através de várias plataformas de alta performance com a Ion Torrent, Roche 454 GS FLX e MiSeq da Illumina. Em função do menor custo, maior número de leitura por amostra e maior Q-score, o que garante qualidade e confiabilidade da sequência, esse trabalho utilizará como método essa última plataforma.

1.3.2- Sequenciamento com o Sistema MiSeq da Illumina

As etapas do sequenciamento da plataforma Illumina são a diluição das bibliotecas, clusterização, sequenciamento e análise dos dados gerados. Antes da realização do sequenciamento é preciso preparar o DNA extraído. Sequências de DNA conhecidas, chamadas de adaptadores, são ligadas ao DNA de interesse a ser sequenciado. Assim os fragmentos de DNA extraído mais os adaptadores são denominadas de bibliotecas. Os adaptadores contêm sequências que permitem a fixação do DNA no 'flowcell' de sequenciamento, a amplificação para formação de clusters e para o sequenciamento propriamente dito (devido a sequência iniciadora) e a identificação dos fragmentos de cada amostra (através de sequências de 6 pb chamadas de bacordes ou índices que permitem a multiplexação) (ILLUMINA, 2017; ILLUMINA, 2018).

Assim, no sistema de sequenciamento MiSeq da Illumina, os fragmentos de interesse são previamente utilizados para construções de bibliotecas. Nessa etapa, são adicionados os adaptadores em ambas as extremidades dos fragmentos a serem sequenciados, um com a finalidade de fixação à placa de sequenciamento e o outro serve como iniciador da reação (A - Fig.05). A placa de vidro ou flowcell possui na sua superfície um denso aglomerado de primers, com certo espaçamento entre eles, onde os fragmentos da biblioteca irão se fixar (B - Fig.05). A extremidade livre com o adaptador, então se pareia com primer adjacente fixado ao flowcell, formando uma estrutura em ponte, que será amplificada com dNTPs não marcados (C e D -Fig.05). Após finalizada a amplificação em ponte, os fragmentos são linearizados e o ciclo se repete cerca de 35 vezes formando milhares de *clusters* com aproximadamente um milhão de fragmentos de um único tipo por aglomerado, que serão utilizados para o sequenciamento. Devido ao espaçamento dos aglomerados de primers do flowcell, cada *cluster* possui sua localização identificada na placa e uma quantidade de fragmentos suficiente para que na etapa de sequenciamento com nucleotídeos marcados com fluoróforos seja possível a detecção de luz pelo sensor do equipamento (ILLUMINA, 2018)

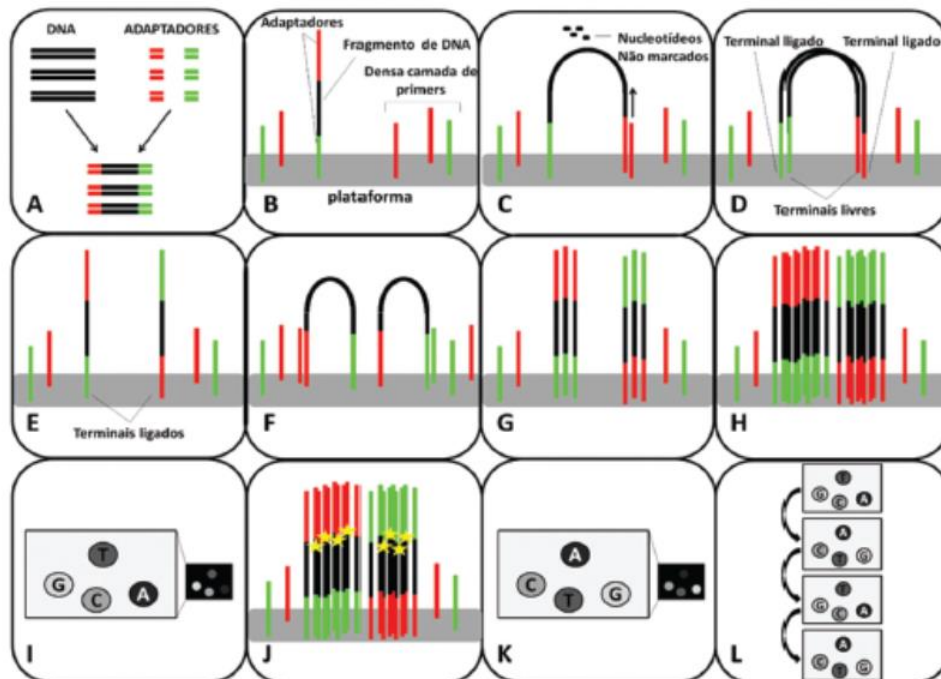


Figura 05- Sistema de sequenciamento MiSeq da Illumina. Fonte: Illumina, (2018)

Após o sequenciamento, as sequências de bases geradas são denominadas de *reads*, as quais estarão no formato FASTQ. Nesse arquivo cada base possui um valor de qualidade apresentada na escala Phred, que é uma escala logarítmica de determinação da

probabilidade de erro da base, o Q (*quality value*). Onde Q = 10 significa que a probabilidade de ocorrer 1 base errada em 10 ou seja 90% de precisão de leitura (SYNGAI *et al.*, 2013).

Tabela 01- Escala de Score Phred.

Q (quality value)	Probabilidade de ocorrer erro na leitura da base	Acurácia
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1000	99,9%
40	1 em 10000	99,99%

Os arquivos FastQ, contendo as *reads* geradas no sequenciamento, são processados usando ferramentas de bioinformática, que irão eliminar leituras de baixa qualidade, bases ambíguas, homopolímeros, sequências indexadoras, *primers*, quimeras e outros DNAs incompatíveis com o fragmento escolhido para análise, além de alinhar sequências complementares e formar *contigs*. Após essas etapas, a ferramenta agrupa as *reads*, por similaridade de sequência, e as classifica como OTUs, Unidades Taxonômicas Operacionais. Por fim, o software busca, em um banco de dados, identificar a que táxon pertence as OTUs geradas. Os dois softwares comumente usados são o QIIME (*Quantitative Insights into Microbial Ecology*) e o Mothur. Já os quatro principais bancos classificadores taxonômicas das OTUs são o Silva, Greengenes, RDP (*Ribosomal Database Project*) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (KOZICH *et al.*, 2013; YILMAZ, *et al.*, 2014; BALVOČIŪTĒ e HUSON, 2017; LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 2018).

No entanto, esses softwares, com as várias referências de classificação, podem apresentar desempenho diverso com diferentes tipos de amostra (KOZICH *et al.*, 2013). Segundo López-García *et al.* (2018) um pipeline de bioinformática é considerado favorável quando maximiza a sensibilidade, com o mínimo de prejuízo na especificidade. Esse mesmo autor, ao trabalhar com conteúdo do TGI, mostra que o Mothur fornece maior diversidade que o QIIME, independentemente do banco de dados de referência, GreenGenes ou Silva. E que essas ferramentas, Mothur e QIIME, quando utilizam o Silva como banco de dados de referência, apesar de não apresentam diferenças estatísticas entre o número final de táxons e abundância relativa (AR) globais, destoam na diversidade beta. Além, de apresentarem divergências, no nível toxonômico mais específico e menos abundante, dependendo do banco de dados de referência (OTUs com <1% da AR com o Silva e OTUs <10% com GreenGenes).

Desta forma, com intuito de minimizar vieses que comprometam análises futuras, relacionadas as espécies menos abundantes e a formatação da comunidade, o presente

tabalho optou por utilizar como ferramenta de bioinformática, o Mothur, por gerar um maior número de OTUs, e o banco de dados Silva, por apresentar menor diferença na AR ao trabalhar com táxons menos representativos.

OBJETIVOS

Considerando o exposto, o objetivo geral desse trabalho é caracterizar a microbiota intestinal de crianças com doença falciforme em uso da antibioticoprofilaxia crônica, através de metagenômica de amostras fecais. Especificamente objetiva-se inferir e comparar, através da riqueza e equabilidade de OTUs: os índices de diversidade alfa e beta; a abundância nos níveis de filo, família e gênero; identificar e comparar a sua composição taxonômica.

MATERIAL e MÉTODOS

3.1- Parcerias

Inicialmente foram realizadas parcerias com a Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Secretaria de Saúde dos municípios baianos de Valença, Taperoá, Igrapiúna e Ituberá, as Associações de Portadores de Doença Falciforme de Ilhéus (BA) e Feira de Santana (BA), Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Salvador para obter suporte estrutural e da equipe multifuncional, principalmente dos profissionais médicos e nutricionistas e com isso facilitar a logística. Através dessas parcerias foram realizadas buscas ativas de pacientes com características de inclusão na pesquisa, para assinaturas dos termos de consentimento e assentimento pelos participantes e responsáveis legais. Em seguida, aplicou-se questionário, para obtenção de dados como: tipo de parto, histórico sobre o tipo de amamentação; índice de massa corpórea; condições socioeconômicas; e outros agravos (Apêndice I). Esse trabalho foi submetido e aprovado no Edital FAPESB Nº 003/2017 - Programa De Pesquisa Para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS/BA - FAIXA 2, nº do pedido 5092/2017, no valor de R\$ 86.600,00.

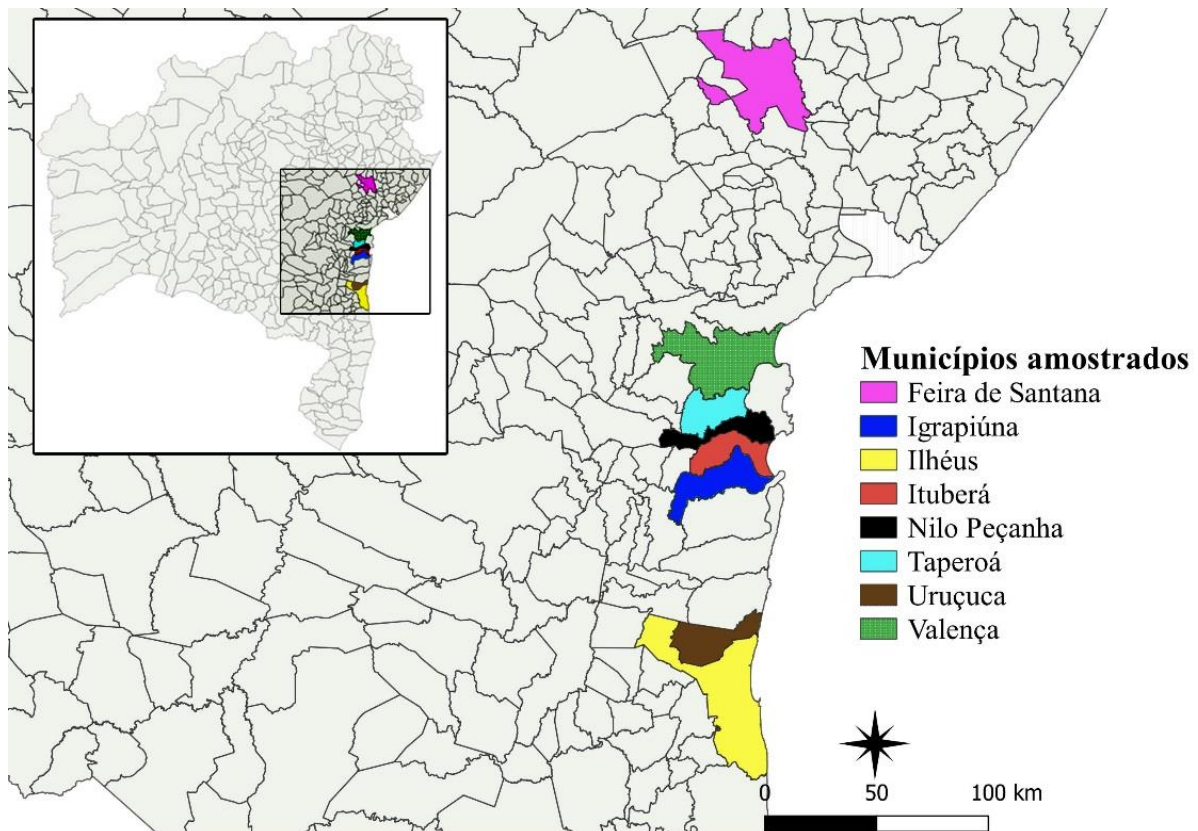


Figura 06- Mapa destacando os municípios baianos onde foram realizadas coletas de fezes.

3.2- Aspectos éticos

Todo o trabalho foi desenvolvido sob os critérios da Regulamentação da Bioética no Brasil, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que determina as diretrizes a serem adotadas nas pesquisas que envolvem seres humanos, atendendo às exigências éticas e científicas fundamentais com registro na Plataforma Brasil com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) sob o número 77667917.0.0000.0056 e aprovado com número do parecer 2.485.943 (ANEXO I). Primeiro no que se refere a eticidade, que implica no consentimento livre e esclarecido dos indivíduos-alvo e a proteção a grupos vulneráveis e aos legalmente incapazes. Seguindo, a ponderação entre riscos e benefícios, tanto atuais como potenciais, individuais ou coletivos, compreendendo-se com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos. Também a garantia de que danos previsíveis serão evitados. Um outro aspecto importante é quanto a relevância social da pesquisa e minimização do ônus para os sujeitos vulneráveis, o que garante a consideração igual dos interesses envolvidos, não perdendo o sentido de sua destinação sócio humanitária.

O trabalho foi desenvolvido com o consentimento e assentimento livres e esclarecidos dos pacientes que vivem com a DF e dos demais participantes da pesquisa através de seus tutores, em linguagem acessível em forma de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e de Assentimento Livre e Esclarecido que foi apresentado pelo investigador no momento da assinatura do documento. Neste constam: informações a respeito da justificativa, os objetivos, o tempo de duração da pesquisa e os procedimentos que serão utilizados; a garantia de esclarecimento antes e durante o curso da pesquisa. Foi outorgado a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da investigação, sem punição e prejuízos. Foi assegurada também a confidencialidade da identidade do paciente e demais participantes, sendo de conhecimento apenas do público envolvido no trabalho e do(s) médico(s) que o acompanha(m) o(s) paciente(s).

3.3- Tamanho da amostra

Avaliamos 30 amostras de fezes de pacientes com DF em uso de antibioticoprofilaxia crônica, com mais de um ano de uso da medicação, e 28 amostras de fezes de pessoas do grupo controle sem doença falciforme e sem uso de antibiótico nos últimos 3 meses (irmãos, primos e crianças da mesma localidade). Os coletores universais eram fornecidos durante a visita de assinatura do TALE e TCLE e aplicação do questionário de pesquisa. As amostras de fezes eram coletadas nas residências dos participantes e transportadas em caixas térmicas contendo gelo seco.

3.4- Coleta das Amostras de Fezes

As amostras de fezes (mínimo aproximado de 20 gramas) foram coletadas pelos participantes e/ou responsáveis em coletor universal estéril na residência do paciente em dia pré-agendado pelo pesquisador. O material imediatamente foi acondicionado em caixas térmicas com gelo seco e transportadas para o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica – LPMC da faculdade de farmácia da UFBA, onde foram acondicionadas a -80°C.

3.5- Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

O DNA genômico das amostras de fezes foi extraído utilizando o kit comercial PowerSoil (MO BIO Laboratories, Inc.), de acordo com a recomendação do fabricante, quantificado em Nanodrop e sua integridade foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1 % utilizando-se tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). No segundo caso, o corante azul de bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%) foi utilizado para acompanhamento visual das amostras de DNA durante a corrida eletroforética e o brometo de etídio 0,05 µl/ml para visualização sob iluminação ultravioleta (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.6- Amplificação do 16S rRNA e produção de bibliotecas

A preparação da biblioteca de sequenciamento foi realizada em um protocolo de dois passos de PCR, o qual demonstrou-se vantajoso, pois melhora a eficiência e otimiza a multiplexação (GOHL *et al.*, 2016). Na primeira PCR o DNA extraído das amostras foi amplificado usando os iniciadores para regiões V3-V4 do gene 16S rRNA, 341F (CCTACGGGRRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), de acordo com protocolo da Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA), uma vez que este par tem grande cobertura taxonômica em Bacteria e Archaea (TAKAHASHI *et al.*, 2014; CAPORASO *et al.*, 2011).

A primeira PCR foi realizada com iniciadores contendo as sequências Illumina baseadas no adaptador de estrutura TruSeq (Illumina, San Diego, CA), que permite a colocação de sequências de indexação na segunda PCR. As PCR foram realizadas com Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA) nas seguintes condições: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45s, 55 °C por 30s e 72 °C por 45s e um extensão final de 72 °C por 2 min para PCR 1. Para a PCR 2 as condições foram 95 °C por 5 min, 10 ciclos de 95 °C por 45s, 66 °C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C durante 2 min de acordo com o protocolo da Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA).

3.7- Sequenciamento de DNA

Os produtos das reações de PCR foram purificados usando AMPure XP Beads (AGENCOURT® AMPure® XP). O DNA foi quantificado através de Picogreen dsDNA kit (Invitrogen, USA). As bibliotecas reunidas foram diluídas para quantificação precisa por qPCR usando KAPA Library Quantification Kit para plataformas Illumina (KAPA Biosystems, Woburn, MA). O sequenciamento das bibliotecas utilizou a plataforma MiSeq da Illumina (Illumina Inc., USA), utilizando o kit V2 de 300 ciclos, *single-end*, com normalização das bibliotecas.

3.8- Análise de Bioinformática

Apesar das sequências brutas terem sido submetidas a um controle de qualidade pela Neoprosecta, onde o sequenciamento foi realizado, as reads passaram por uma nova triagem de qualidade para rastreamento de bases ambíguas e homopolímeros usando MOTHUR v. 1.43.0 (<http://www.mothur.org>), de acordo com tutorial MiSeq SOP (SCHLOSS *et al.* 2013). Além disso, quimeras foram detectadas utilizando o algoritmo UCHIME (<http://drive5.com/uchime>).

As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e a classificação taxonômica foram determinadas por meio do pipeline MOTHUR e do banco de dados de referência Silva v132 (https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files#Release_132) para obter a composição da microbiota do TGI do grupo com DF e controle. As OTUs foram determinadas por meio de níveis de similaridade entre sequências de pelo menos 97% para a classificação de um microrganismo no nível da espécie, conforme proposto por DRANCOURT *et al.* (2000).

A análise de alfa e beta-diversidade foi conduzida com o pacote Phyloseq e Vegan do programa R (Oksanen *et al.*, 2016, McMurdie and Holmes, 2013). Após normalizar as reads, as OTUs observadas e os índices de diversidade Chao1, Shannon e Simpson invertido (InvSimpson) foram calculados para estimar a riqueza de espécies nas amostras. A beta diversidade foi calculada utilizando o índice Bray-Curtis para cada amostra separadamente e ordenado por análise de coordenadas principais (PCoA).

Algumas das vantagens dos índices de diversidade é a possibilidade de concentrar numa mesma medida, duas métricas da comunidade (riqueza e equabilidade), além de expressar estatisticamente esses atributos comunitários e possuir independência do esforço amostral (MELO, 2008; LIMA *et al.*, 2016).

O Índice de Shannon (H') é um dos principais parâmetros para avaliação de diversidade biológica e possui como métricas a riqueza (números de espécies) e a equabilidade (uniformidade entre as abundâncias relativas das espécies presentes na

comunidade amostrada) porém dá um peso maior a riqueza de espécies. Ele é obtido através da fórmula $H' = -\sum p_i \ln p_i$, onde p_i é a abundância relativa da espécie x , \ln o logaritmo natural, também conhecido como logaritmo neperiano. Assim, duas comunidades, A e B, ambas com 100 indivíduos amostrados, com a seguinte distribuição de espécies, A (50; 30 e 20) e B (40; 40 e 20) possuirão respectivamente $H'=1,03$ e $H'=1,06$. Possuem o mesmo número de indivíduos e a mesma riqueza, porém diferenças na uniformidade entre as espécies. Uma outra comunidade denominada de C, também com 100 indivíduos e a seguinte distribuição das espécies C (50; 50) possui $H'= 0,7$. Já uma amostra denominada de D, com apenas uma única espécie, o p_i será igual a 1, pois a espécie em questão representa 100% dos indivíduos amostrados. Considerando que o \ln de 1 (um) é igual a 0 (zero), ao aplicar o \ln de 1 na fórmula de Shannon teremos $H'=0$. Em outras palavras, uma comunidade com uma única espécie possui zero de diversidade pelo índice Shannon (MELO, 2008; LIMA *et al.*, 2016).

Tabela 02- Exemplo de comunidades com mesmo população amostral, porém com divergencia no Índice de Diversidade de Shannon (H').

Comunidade	Total de Indivíduos na amostra	p_i Espécie 1	p_i Espécie 2	p_i Espécie 3	$H' = -\sum p_i \ln p_i$
A	100	50/100	30/100	20/100	$H'=1,03$
B	100	40/100	40/100	20/100	$H'=1,06$
C	100	50/100	50/100		$H'=0,7$
D	100	100/100			$H'=0$

Fonte: Exemplos criados a partir da abordagem disponível em: <http://www.tiem.utk.edu/~gross/bioed/bealsmodules/shannonDI.html>

Assim como o índice Shannon, o Índice de Simpson também leva em consideração as métricas riquezas e equabilidade, porém com peso maior para equabilidade. E refere-se a três índices intimamente relacionados: Índice de Simpson (D); Índice de Diversidade de Simpson ($1-D$); e Índice Recíproco de Simpson ($1 / D$). Onde D pode ser calculado com as seguintes fórmulas $D = \sum (n/N)^2$ ou $D = (\sum n(n-1)) / (N(N-1))$ sendo n = número total de organismos de uma espécie específica e N = número total de organismos de todas as espécies da comunidade amostrada (MELO, 2008; LIMA *et al.*, 2016).

O Índice de Simpson varia de 0 a 1 e mede a probabilidade de dois indivíduos retirados ao acaso da comunidade pertencerem a mesma espécie, 0 (zero) representa diversidade infinita e 1 nenhuma diversidade. Caso a comunidade X possua uma única espécie, $n=N$ o D será 1, pois como todos os membros pertencem a mesma espécie ao

dividir n por N o resultado será igual a 1 e assim a probabilidade de se retirar dois indivíduos da mesma espécie é 100% o que significa nenhuma diversidade (MELO, 2008; LIMA *et al.*, 2016).

Quanto maior o índice de Simpson menor a diversidade e essa interpretação pode gerar intuitivamente um ruído de compreensão. Para superar esse problema, D é subtraído de 1 surgindo o Índice de Diversidade de Simpson (1-D) que mede a probabilidade de dois indivíduos retirados ao acaso da comunidade pertencerem a espécies diferentes. Dessa forma a comunidade X exemplificada no parágrafo anterior com $D = 1$ teria 0 para o Índice de Diversidade de Simpson (1-D), assim a probabilidade de dois indivíduos dessa comunidade pertencerem a espécies diferentes é 0%. O Índice de Diversidade de Simpson (1-D) também varia de 0 a 1, porém neste caso o 0 representa nenhuma diversidade e 1 diversidade infinita (MELO, 2008; LIMA *et al.*, 2016).

Já o Índice Recíproco de Simpson $1 / D$ assume valores que começam com 1 como o valor mais baixo possível, representando nenhuma diversidade e aumentam infinitamente influenciada pela riqueza e equabilidade da comunidade (MELO, 2008; LIMA *et al.*, 2016).

Tabela 03- Exemplos de como calcular os: Índice de Simpson (D); Índice de Diversidade de Simpson (1-D); e o Índice Recíproco de Simpson (1/D).

Comunidade	Total de Indivíduos na amostra	p_i Espécie 1	p_i Espécie 2	p_i Espécie 3	p_i Espécie 4	p_i Espécie 5	Exemplos1:
A	100	50/100	30/100	20/100			Índice de Simpson $D = \sum p_i^2$ $D = 0,25 + 0,09 + 0,04 = 0,38$ Índice de Diversidade Simpson = $1 - D$ ou $1 - 0,38 = 0,62$ Índice Recíproco de Simpson $1 / D$ ou $1 / 0,38 = 2,6$
Comunidade	Total de Indivíduos na amostra	p_i Espécie 1	p_i Espécie 2	p_i Espécie 3	p_i Espécie 4	p_i Espécie 5	Exemplos2:
B	100	20/100	20/100	20/100	20/100	20/100	Índice de Simpson $D = \sum p_i^2$ $D = 0,04 + 0,04 + 0,04 + 0,04 + 0,04 = 0,2$ Índice de Diversidade Simpson = $1 - D$ ou $1 - 0,2 = 0,80$ Índice Recíproco de Simpson $1 / D$ ou $1 / 0,2 = 5$

Fonte: Exemplos criados a partir da abordagem disponível em: <http://www.countrysideinfo.co.uk/simpsons.htm>

Apesar de úteis e muito utilizados, os índices de diversidade devem ser analisados com cautela, pois apresentam algumas limitações explanados na tabela 04, onde comunidades com as mais diversas configurações de riqueza e equabilidade podem possuir os mesmos valores de H' e D . Uma outra limitação é a arbitrariedade dos pesos atribuídos para riqueza e equabilidade e a falta de métrica para o valor biológico inerente a presença e representatividade da espécie na comunidade (MELO, 2008).

Tabela 04- Exemplos de comunidade com o mesmo Índice de Diversidade de Shannon, porém com formatação comunitária divergente.

Comunidade	Total de Indivíduos	π Espécie 1	π Espécie 2	π Espécie 3	$H' = -\sum \pi_i \ln \pi_i$
A1	100	50/100	30/100	20/100	$H' = 1,03$
A2	100	50/100	20/100	30/100	$H' = 1,03$
A3	100	30/100	50/100	20/100	$H' = 1,03$
A4	100	30/100	20/100	50/100	$H' = 1,03$
A5	100	20/100	50/100	30/100	$H' = 1,03$
A6	100	20/100	30/100	50/100	$H' = 1,03$
D1	100	100/100			$H' = 0$
D2	100		100/100		$H' = 0$
D3	100			100/100	$H' = 0$
Comunidade	Total de Indivíduos	π Espécie 4	π Espécie 5	π Espécie 6	$H' = -\sum \pi_i \ln \pi_i$
A7	100	50/100	30/100	20/100	$H' = 1,03$
A8	100	50/100	20/100	30/100	$H' = 1,03$
A9	100	30/100	50/100	20/100	$H' = 1,03$
A10	100	30/100	20/100	50/100	$H' = 1,03$
A11	100	20/100	50/100	30/100	$H' = 1,03$
A12	100	20/100	30/100	50/100	$H' = 1,03$
D4	100	100/100			$H' = 0$
D5	100		100/100		$H' = 0$
D6	100			100/100	$H' = 0$

Fonte: Exemplos criados a partir da abordagem disponível em: <http://www.tiem.utk.edu/~gross/bioed/bealsmodules/shannonDI.html>

Uma vasta gama de índices de diversidade está disponível, porém, os aqui adotados esclarecem os principais aspectos inerente as comparações da biodiversidade entre as amostras, tais como: riqueza, equabilidade e riqueza compartilhada. O uso em conjunto de vários estimadores de riqueza dá suporte mais amplo aos resultados da diversidade biológica dentro e entre as amostras.

Os estimadores não paramétricos de espécies operam usando o número de espécies raras (com 10 ou menos indivíduos) encontradas em uma amostra como uma maneira de calcular a probabilidade de haver mais espécies não descobertas e extrapolam os dados

para descobrir qual pode ter sido o número "verdadeiro" de espécies (COLWELL e CODDINGTON, 1994).

Desenvolvidos pela pesquisadora Anne Chao da universidade de Taiwan e colaboradores, alguns dos estimadores de diversidade mais utilizados como o Chao-1, Chao-2, possuem diferentes equações que levam em consideração número, relação e frequência entre singletons (número de espécies com apenas uma ocorrência na amostra) e doubletons (o número de espécies com exatamente duas ocorrências na amostra). O estimador Chao1 pode ser obtido com a seguinte formula:

$$S_1 = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2}$$

Onde S_1 ou S_{chao1} ou S_{est} corresponde a número estimado de espécies, S_{obs} é o número total de espécies encontradas na amostra, F_1 singletons e F_2 doubletons.

O estimador Chao2, ao invés de dados de abundância, utiliza informações de frequência de espécies nas várias amostras para estimar a diversidade de espécies do todo (Chao 1987; Colwell e Coddington 1994). Neste estimador singletons- F_1 e doubletons- F_2 da amostra são substituídos por dados do conjunto amostral, com os singletons- Q_1 (espécies que ocorre em apenas uma das amostras) e doubletons- Q_2 (espécies que ocorrem em duas amostras). Assim seu cálculo é virtualmente parecido com Chao1, com a substituição de F_1 e F_2 por Q_1 e Q_2 , respectivamente.

$$S_2 = S_{obs} + \frac{Q_1^2}{2Q_2}$$

A heurística por trás desses estimadores é que, se espécies raras (singletons) continuarem sendo descobertas em uma comunidade amostrada, é provável que mais espécies raras continuem sendo encontradas à medida que se aumenta o esforço amostral. E assim que todas as espécies tiverem sido recuperadas pelo menos duas vezes (doubletons), provavelmente não haverá mais espécies a serem descobertas.

Além dos estimadores de riqueza Chao-1 e Chao-2, Ane Chao e colaboradores desenvolveram o Estimador de Cobertura Baseado em Incidência- ICE (Incidence Coverage-based Estimator) e Estimador de Cobertura Baseado em Abundância- ACE (Abundance Coverage-based Estimator), que utilizam um conjunto complexo de cálculos matemáticos, mas que possuem como axioma dados das espécies mais abundantes- S_{comum} (maior de 10 indivíduos), e as especies raras- S_{rare} (menor e igual a 10 indivíduos).

$$S_{ace} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ace}} + \frac{F_1}{C_{ace}} \gamma_{ace}^2$$

Onde

$$N_{rare} = \sum_{i=1}^{10} iF_i ; \quad C_{ace} = 1 - \frac{F_1}{N_{rare}} ; \quad e \quad \gamma_{ace}^2 = \max \left[\frac{S_{rare}}{C_{ace}} \frac{\sum_{i=1}^{10} i(i-1)F_i}{(N_{rare})(N_{rare}-1)} - 1, 0 \right]$$

Tabela 05- Significados dos símbolos para o cálculo do índice de diversidade ACE.

Símbolos	Significado
S_{obs}	Número total de espécies observadas em todas as amostras reunidas
S_{est}	Riqueza estimada de espécies, em que est é substituído na fórmula pelo nome do estimador
$S_{abundante}$	Número de espécies abundantes (cada uma com mais de 10 indivíduos) quando todas as amostras são reunidas
S_{raro}	Número de espécies raras (cada uma com 10 ou menos indivíduos) quando todas as amostras são reunidas
F_i	Número de espécies que possuem exatamente i indivíduos quando todas as amostras são reunidas (F_1 é a frequência de singletons, F_2 é a frequência de doubletons)
Q_j	Número de espécies que ocorrem exatamente em j amostras (Q_1 é a frequência de únicos, Q_2 é a frequência de duplicatas)
N_{raro}	Número total de indivíduos em espécies raras
C_{ace}	Estimador de cobertura da abundância da amostra
γ_{ace}^2	Coeficiente de variação estimado da F_i para espécies raras
γ_{ice}^2	Coeficiente de variação estimado do Q_i para espécies infrequentes

Fonte: <http://viceroy.colorado.edu/estimates/EstimateSPages/EstSUsersGuide/EstimateSUsersGuide.htm#Chao2>

3.9- Programa estatístico empregado

Toda análise se realizará empregando o programa R versão 3.6.1 para Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando em conta a estreita relação da microbiota intestinal e o seu hospedeiro, bem como as possíveis alterações sistêmicas que o TGI pode causar em humanos, é necessário uma abordagem mais holística de resultados e discussões (CLEMENTE *et al.*, 2012). Considerando que além dos índices de diversidade e da análise de coordenadas principais, há interações específicas de certos táxons com os seus hospedeiros que precisam ser elucidadas, e nesta pesquisa, em um grupo pediátrico com a doença falciforme.

Para contribuir com a compreensão desta relação, foram coletadas 58 amostras de fezes para análise do microbioma intestinal, sendo 30 amostras de pacientes pediátricos com a DF e 28 controles. Do total de 30 crianças do grupo com DF, 21 possuíam controles pareados por residência, grau de parentesco (irmãos ou primos), sujeitos às condições ambientais semelhantes e relacionados geneticamente. Ressaltando, que entre os municípios contactados para a realização desse trabalho, foi feita a coleta de fezes de todas as crianças com DF (exceto no município de Feira de Santana, onde foram coletadas amostras de quatro crianças com DF, limitado pelo número de exames disponíveis). As coletas foram realizadas obedecendo todos os critérios de inclusão e as crianças que participaram da pesquisa foram localizadas através dos Agentes Comunitários de Saúde (ACS) de cada município ou pelas Associações de Pessoas com Doença Falciforme.

Com intuito de minimizar erros de interpretação dos resultados entre os grupos, foi realizado o levantamento de informações consolidadas pela literatura como variáveis que interferem na composição da microbiota intestinal, como: o tipo de parto; aleitamento materno; Índice de Massa Corpórea - IMC; localidade; e condições socioeconômicas. Para isso, foi utilizado um questionário estruturado como instrumento de coleta das informações (Tabela 06).

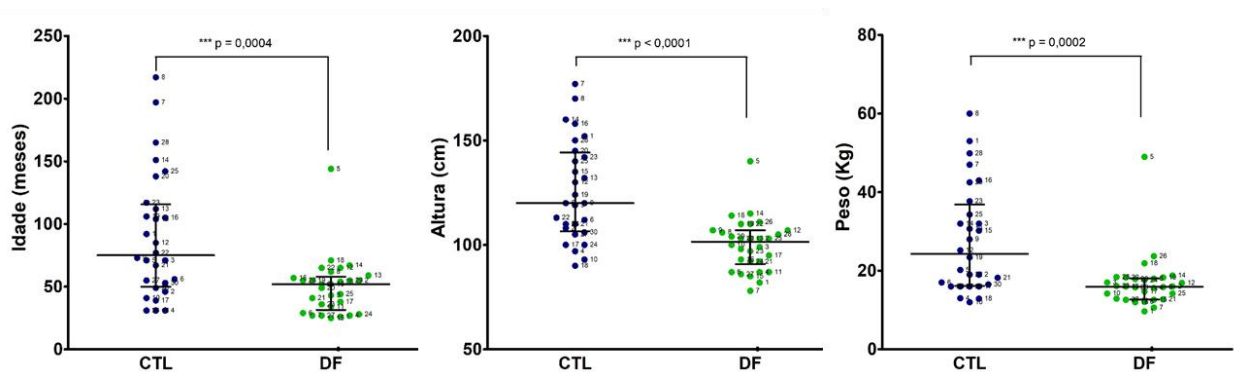


Figura 07-Distribuição dos Índices antropométricos do grupo de crianças com doença falciforme e os controle, usando teste estatístico de Mann-Whitney.

De acordo com o alguns dados antropométricos obtidos nessa pesquisa, o grupo com DF apresentou menor média e amplitude na distribuição de idade e consequentemente menor peso e altura com relação ao controle (Figura 07), pois na infância e adolescência esse índices possuem uma correlação positiva. Essas diferenças na distribuição da idade, e automaticamente do peso e altura, ocorreram devido ao processo de inclusão e exclusão da pesquisa. No grupo com DF eram incluídos os maiores de dois anos e em uso de antibioticoprofilaxia, que normalmente é até os cinco anos de idade, apenas um paciente com idade superior a cinco anos em uso de antibioticoprofilaxia foi encontrado. Já no grupo controle, os critérios de inclusão eram idade maior e igual a dois anos e o não uso de antibiótico nos últimos três meses. Assim, a idade superior aos cinco anos não era fator de exclusão. Visto que, após a instalação da microbiota definitiva em torno dos dois anos de idade, ela mantém-se estável ao longo da vida do hospedeiro (GUARNER e MALAGELADA JR., 2003).

Na análise dos questionários, o total 63% (19) crianças com DF e 43% (12) controles não receberam aleitamento materno exclusivo mínimo de seis meses. As análises estatísticas utilizando o teste do qui-quadrado não demonstraram diferenças significantes entre os grupos ($p = 0,12$). Segundo o Ministério da Saúde (2009) o aleitamento materno exclusivo (AME) até o sexto mês de vida é a estratégia isolada que mais previne a mortalidade infantil. O AME melhora o desenvolvimento cognitivo da criança, estimula o GALT, reduz alergias, infecções dos tratos urinário, respiratório e gastrointestinal, além de conter endorfinas que diminuem a sensibilidade a dor.

O leite materno, além de conter todos constituintes nutricionais exigidos pela criança, influencia na formação da microbiota intestinal, pois contém prebióticos como o fator bífido, conhecido por facilitar o crescimento de grupos de microrganismos denominados bifidobactérias, leucócitos e anticorpos capazes de limitar a presença de determinados grupos de microrganismos (KONGNUM *et al.*, 2020; MOSCA e GIANNÌ, 2017; BZIKOWSKA *et al.*, 2017). Segundo Harmse *et al.* (2000) cerca de 90% da composição da microbiota intestinal de crianças amamentadas exclusivamente de leite materno é formada por *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, microrganismos indicadores de microbiota saudável. Segundo Bäckhed *et al.* (2015), o fim do desmame é o fator mais importante para o desenvolvimento de uma microbiota parecida com a dos adultos.

Tabela 06- Dados descritivos dos grupos avaliados com DF (n=30) e controle (n=28).

Grupo de Crianças com DF					Grupo Controle			
	Percentual	Média	DesvPad	CV	Percentual	Média	DesvPad	CV
Genótipo SS	53,3% (16)							
Genótipo SC	43,3% (13)							
Genótipo SβTalass	3,3 % (1)							
Sexo F	56,7% (17)				55,6% (16)			
Sexo M	43,3% (13)				44,4% (12)			
Idade (ano)		4,15	1,92	46%		9,09	4,18	46%
Altura (m)		1,0	0,13	13%		1,35	0,24	18%
Peso (Kg)		16,72	6,87	41%		33,09	13,64	41%
Parto Vaginal	63,3% (19)				61% (17)			
Parto Cesário	36,7% (11)				39% (11)			
Zona Urbana	77% (23)				75% (21)			
Zona Rural	23% (7)				25% (7)			
Média de TAM (mês)		17,5	11,1	63%		18,95	11,58	61%
Média de TAME (mês)		4,4	3,9	89%		6,41	5,46	85%
DTGI	53,3% (16)				11% (3)			
IMC	27% (8) Baixo Peso 43% (13) Normal 13% (4) Sobrepeso 17% (5) Obesos				21% (6) Baixo Peso 50% (14) Normal 18% (5) Sobrepeso 11% (3) Obesos			

TAM=Tempo de Amamentação; TAME=Tempo de Amamentação Exclusiva; DTGI=Distúrbio do Trato Gastrointestinal; IMC=Índice de Massa Corpórea; CV=Coefficiente de Variação.

Considerando outra variável que interfere no estabelecimento da microbiota intestinal, foi obtido pelo instrumento de coleta de informações, em ambos os grupos, um alto percentual de partos cesáreos (Tabela 06). Estudos já demonstraram que indivíduos nascidos de parto vaginal apresentam maior percentual de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em sua microbiota intestinal quando comparado às crianças que nasceram de parto cesáreo (ANDRADE, 2010), pois, a passagem da criança pelo canal vaginal permite a formação de

sua microbiota por microrganismos maternos presentes neste ambiente. No entanto, crianças nascidas de parto cesáreo iniciam essa colonização por microrganismos presentes em outro ambiente, principalmente o hospitalar (ANDRADE, 2010). Segundo Bäckhed *et al.* (2015), 72% da composição da microbiota intestinal de recém-nascidos por parto vaginal é proveniente da mãe, enquanto crianças de parto cesariano possui apenas 41% dos microrganismos de origem materna.

Dessa forma, o processo inicial de colonização bacteriana proporcionado pelos tipos diferentes de amamentação e de parto, causa uma assinatura microbiana que conduzirá ao estabelecimento de uma comunidade saudável ou disbiótica ao longo de toda a vida (MARTIN *et al.*, 2010; WOPEREIS *et al.*, 2014).

Apesar da Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendar o limite máximo de 15% nas taxas de partos cesarianos, considerando os inúmeros benefícios que o parto vaginal pode proporcionar à saúde da mãe e da criança, o Brasil está em segundo lugar no mundo como país com os maiores índices de parto cesariano, 43,8%, ficando atrás apenas do Chipre, que teve 50,9% (PINHEIRO e BITTAR, 2012). Dados do Sistema Nacional de Nascidos Vivos (SINASC) demonstram que nos anos de 2016, 2017 e dados preliminares de 2018, os percentuais de partos cesarianos no Brasil são de 55,4%, 55,7% e 44% respectivamente (BRASIL-MS-DATASUS, 2020). Sendo assim, os valores encontrados para os grupos estudados estão dentro dessa estimativa nacional.

Outro dado apresentado da Tabela 06, foi o percentual elevado de crianças com doença falciforme que apresentaram algum sinal ou sintoma de Distúrbio no Trato Gastrointestinal (DTGI), tais como: diarreia 50% (8), prisão de ventre 31,3% (5), gases 50% (8), comparado ao controle ($X^2 = 0,0005$). Segundo Lopes *et al.* (2017) as disbioses intestinais podem ser as principais responsáveis por tais manifestações.

A Tabela 06 demonstra que aproximadamente 30% dos grupos avaliados apresentaram indivíduos com excesso de peso. Esta informação representa um risco adicional aos agravos na saúde da pessoa que vive com a DF, visto que o acúmulo de gordura corporal causa hipertensão pulmonar, apneia e inflamação crônica. O tecido adiposo torna-se sítio de células inflamatórias, principalmente macrófagos M1, gerando níveis mais elevados de citocinas pro-inflamatórias circulantes (COX *et al.*, 2015; IZAOLA *et al.*, 2015). Uma das correlações mais fortes da microbiota intestinal com a homeostase do hospedeiro refere-se ao aproveitamento energético e o ganho de peso (WAN *et al.*, 2020; TORRES-FUENTES *et al.*, 2017). Considerando este conteúdo importante para discussão, serão apresentados mais adiante táxons que divergem quanto à abundância e frequência relativa entre os grupos de crianças estudadas com doença falciforme e controles e as possíveis implicações dessas diferenças acerca do ganho energético.

E por fim os dados descritivos dos grupos mostram que a renda per capita é de aproximadamente 25% do salário mínimo, o que classifica seus participantes como pertencentes a classes economicamente vulneráveis. Fato que segundo Mello *et al.* (2016) é mais uma importante variável relacionada ao estabelecimento da microbiota intestinal. No entanto, entre doentes e controle essa variável perde o efeito, pois ambos os grupos apresentam a mesma configuração de renda.

4.1- Resultados Metagenômicos e Índices de Diversidade

Após sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S rRNA e análise das sequências com os Softwares Mothur v. 1.43.0, foram obtidas 4.093.842 *reads*, classificadas em 584.285 OTUs, com média de cobertura da região sequenciada por amostra superior a 70 mil leituras e amplitude de 31.030 a 164.433 *reads*. Apesar do grupo com DF apresentar uma média inferior do número de leituras comparado ao grupo controle, não houve significância estatística ($p = 0,73$) (Tabela 07).

Com a análise de bioinformática das *reads*, identificou OTUs dos reinos Archeae e Bacteria. Dessas, 99% pertenceram a filos bacterianos, sendo *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacterias* os com maior riqueza de OTUS respectivamente (Figuras 13, 14 e 15) bem como os filos que juntos representam aproximadamente 99,5% da abundância da microbiota intestinal dos grupos estudados (Tabela 09).

A análise dos principais índices de diversidade alfa e beta demonstrou que a frequência de *reads* relacionadas aos diferentes táxons nas amostras obtidas das crianças com DF é significativamente menos diversa do que em crianças do grupo controle (Tabela 08 e Figura 07). O padrão de diversidade da microbiota intestinal é influenciado por fatores diferentes, alguns intrínsecos como a genética e o metabolismo do hospedeiro, e outros extrínsecos como tipo de parto, aleitamento materno, dieta, estilo de vida, e o uso de antimicrobianos que tem sido considerado o principal fator que altera esta composição (ZHANG *et al.*, 2015; WOPEREIS *et al.*, 2014).

Tabela 07- Número de *reads* por indivíduos do grupo DF e CTL após processamento no Mothur.

Doentes Falciforme	Nº de Reads Mothur	Controle	Nº de Reads Mothur
01DF*	45036	01C*	65501
02DF*	53810	02C***	131459
03DF*	51514	03C*	49823
04DF*	58324	04C***	122295
05DF*	50843	05C***	136126
06DF*	50631	06C*	52631

07DF*	49195	07C*	60362
08DF*	52636	08C*	53748
09DF*	52363	09C*	53911
10DF*	55875	10C*	50831
11DF*	55126	12C*	56137
12DF**	53118	13C**	33859
13DF**	56897	14C**	57862
14DF**	54384	15C**	54433
15DF**	44550	16C**	55940
16DF**	49928	17C***	127136
17DF**	49276	18C**	31030
18DF**	38149	19C**	63066
19DF**	45424	20C**	51481
20DF**	50895	21C***	81003
21DF**	57509	22C**	48626
22DF**	48386	23C***	120842
23DF***	115247	24C***	110811
24DF***	63212	25C***	130277
25DF***	61523	26C***	57454
26DF***	54780	27C***	126865
27DF***	90966	28C/29C***	121220
28DF***	128307	30C***	164433
29DF***	103975		
30DF***	130350		
Média	62407	Média	79344
Amplitude	38149-130350	Amplitude	31030-164433
Desv Pradiao	21453	Desv Pradiao	34722

Sublinhado corresponde a amostras pareadas; *Amostras sequenciadas no primeiro lote; **Amostras sequenciadas no segundo lote; ***Amostras sequenciadas no terceiro lote.

Tabela 08- Índices de Diversidade de Simpson (1-D), Shannon (H') e Chao-1 por individuo no grupo DF e CTL.

Amostra do Doente Falciforme	Índice de Diversidade Simpson_1-D do DF	Índice de Shannon do DF	Índice de Chao-1 do DF	Amostra do Controle	Índice de Diversidade Simpson_1-D do CTL	Índice de Shannon do CTL	Índice de Chao-1 do CTL
01DF	0,8236	2,789	1,37E+04	01C	0,9784	5,107	1,67E+05
02DF	0,9826	5,869	2,32E+05	02C	0,9859	6,747	7,56E+05
03DF	0,98	5,876	2,34E+05	03C	0,978	5,798	2,06E+05
04DF	0,9823	5,704	2,36E+05	04C	0,9334	5,117	2,84E+05
05DF	0,9814	5,904	2,54E+05	05C	0,9812	6,524	8,64E+05
06DF	0,9352	4,291	7,06E+04	06C	0,9676	5,238	1,51E+05
07DF	0,9874	6,21	1,62E+05	07C	0,9927	6,686	2,08E+05
08DF	0,9823	5,598	2,28E+05	08C	0,9909	6,452	2,54E+05
09DF	0,9674	5,562	1,06E+05	09C	0,9227	4,364	8,08E+04
10DF	0,9632	4,985	2,07E+05	10C	0,991	6,455	2,47E+05
11DF	0,9386	4,372	7,46E+04	12C	0,988	6,181	2,22E+05
12DF	0,991	6,296	2,50E+05	13C	0,9849	6,215	2,65E+05
13DF	0,979	5,469	2,23E+05	14C	0,9677	4,686	6,05E+04
14DF	0,9806	5,691	2,11E+05	15C	0,9807	5,721	1,96E+05
15DF	0,895	4,119	7,87E+04	16C	0,9762	5,18	1,88E+05
216DF	0,9399	4,659	1,15E+05	17C	0,9697	5,946	6,01E+05
17DF	0,9279	4,925	1,70E+05	18C	0,989	6,003	1,21E+05
18DF	0,9814	5,584	2,18E+05	19C	0,9623	5,093	1,22E+05
19DF	0,9134	3,712	4,95E+04	20C	0,9919	6,707	3,96E+05
20DF	8,44E-01	3,82E+00	1,23E+05	21C	9,40E-01	5,20E+00	2,37E+05
21DF	8,43E-01	2,82E+00	2,87E+04	22C	9,87E-01	6,01E+00	2,72E+05
22DF	0,9472	3,988	6,30E+04	23C	0,9886	6,867	9,89E+05
23DF	0,9855	6,701	1,05E+06	24C	0,7275	2,991	8,66E+04
24DF	0,9875	6,487	5,15E+05	25C	0,9884	6,606	9,67E+05
25DF	0,9756	5,829	2,22E+05	26C	0,9883	6,795	3,52E+05
26DF	0,937	5,406	2,52E+05	27C	0,988	6,662	6,30E+05
27DF	0,8594	3,59	9,04E+04	28C	0,9711	5,85	4,10E+05
28DF	0,9845	6,107	8,41E+05	30C	0,9691	5,432	3,71E+05
29DF	0,9112	4,109	1,17E+05				
30DF	0,8522	4,486	2,57E+05				
Média	0,942	5,0319	2,23E+05	Média	0,967	5,808	3,47E+05
Des.Padrão	0,052	1,073	221356	Des.Padrão	0,050	0,896	267041

Nível de significância estatística com amostras não pareadas utilizando Mann Whitney Test: Shannon ($p < 0,004$); Chao-1 ($p=0,02$); Simpson_1-D ($p < 0,01$). Nível de significância estatística com amostras pareadas utilizando Mann Whitey Test: Shannon ($p < 0,003$); Chao-1 ($p < 0,05$); Simpson_1-D ($p < 0,003$).

Os índices de Chao1 e ACE apresentados na figura 07 demonstraram que o grupo com DF possuiu menor riqueza de espécies raras quando comparado ao grupo controle. Nessa mesma figura, os índices de Shannon e Simpson demonstraram que esse grupo além de menor riqueza, apresentou menor equabilidade entre as espécies. Uma explicação possível para isso pode ser fundamentada no uso crônico do antibiótico, uma vez que espécies menos abundantes são as mais afetadas em perturbações comunitárias e que esse tipo de droga pode agir seletivamente em determinados grupos, alterando a sua representatividade dentro da comunidade (BECATTINI *et al.*, 2016; BOBROWSKI e BIONDI, 2016; PERONI e HERNÁNDEZ, 2011; JERNBERG *et al.*, 2007).

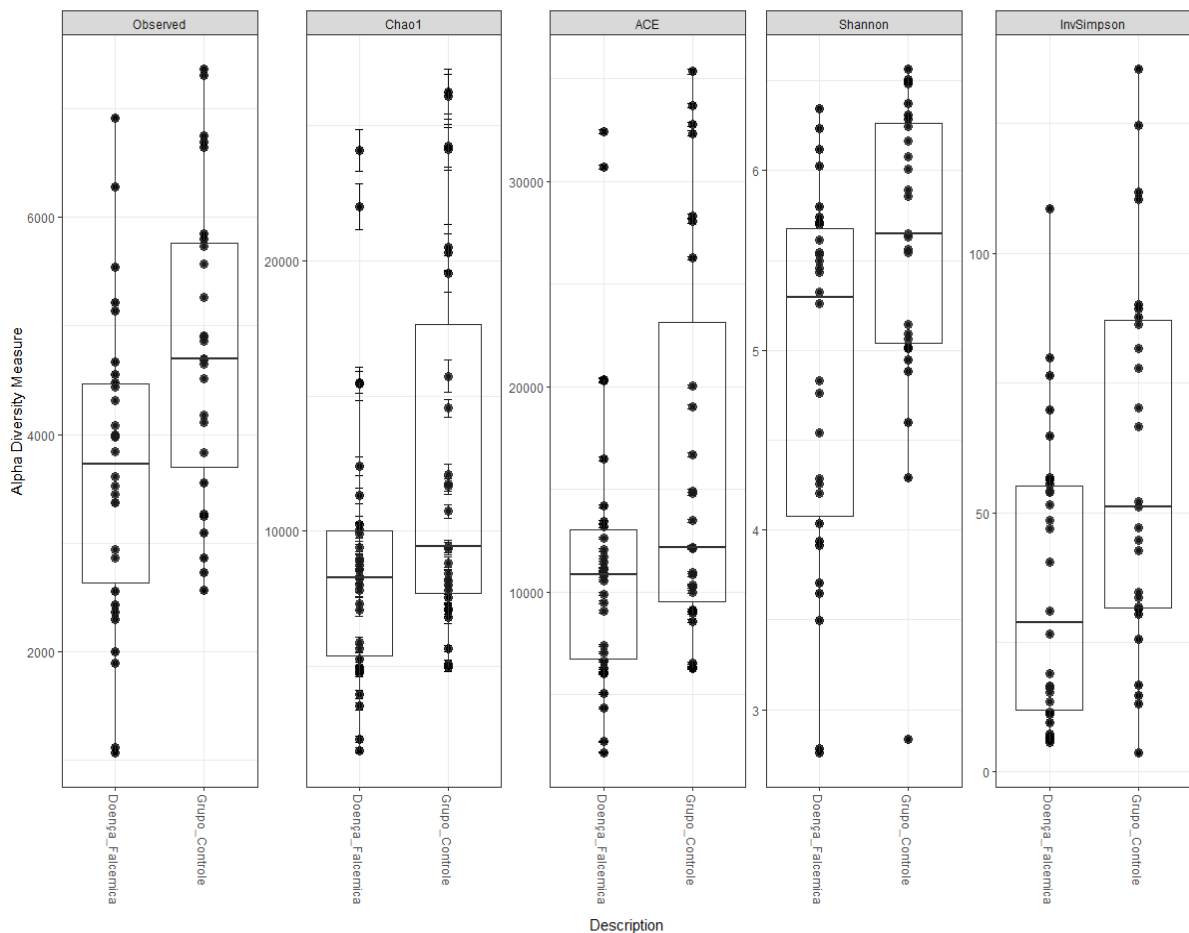


Figura 08- Medição da diversidade alfa através de estimadores de riqueza Chao1 e ACE e índices de diversidade Shannon e Simpson, a partir de amostras de fezes de crianças com DF em antibioticoprofilaxia crônica e grupo controle.

A análise de coordenadas principais (PCoA) dos 58 microbiomas demonstrou que os pacientes com DF em uso da antibioticoprofilaxia crônica apresentaram maior variação na diversidade beta da microbiota intestinal, e que essas diferenças não foram identificadas quando considerado o tipo de parto e o tipo de amamentação (Figuras 08 e 09), que são importantes para o estabelecimento da microbiota intestinal, corroborando com as

informações sobre o uso do antibiótico como fator limitante da microbiota intestinal (BECATTINI *et al.*, 2016; VANGAY *et al.*, 2015; JERNBERG *et al.*, 2007).

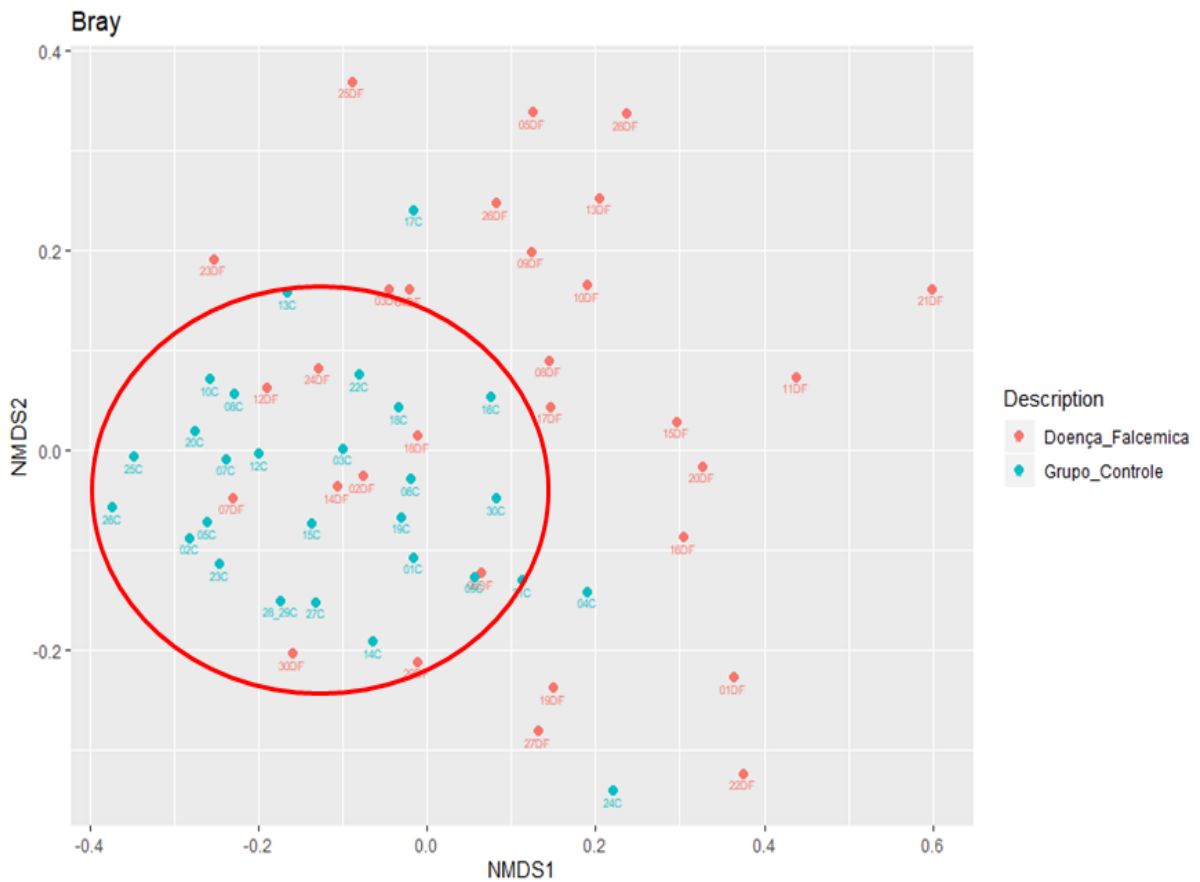


Figura 09 - Diversidade beta da microbiota intestinal de crianças com DF em antibioticoprofilaxia crônica e grupo controle.

Como a matriz de Bray-Curtis utiliza a intersecção das espécies menos abundantes e essas são as mais afetadas em situações de perturbações comunitárias, a maior distância entre os microbiomas identificados através do sequenciamento genético das amostras de fezes oriundas do grupo de crianças com DF, indica uma menor riqueza dessas espécies nesse grupo. A figura 09 também apresenta um menor compartilhamento de espécies e que não foi possível uma separação completa entre os grupos com DF e CTL, possivelmente devido a existências de núcleos microbianos comuns, como os enterotipos.

Outra observação foi que a composição das *reads* de algumas amostras no grupo das crianças com DF se aproximaram às do grupo CTL e vice-versa, demonstrando que indivíduos em uso de antibioticoprofilaxia crônica e grupo controle podem apresentar uma composição da microbiota semelhante a de indivíduos saudáveis, assim como indivíduos considerados saudáveis podem possuir um microbiota próxima a indivíduos com DF e sob o

uso da antibioticoprofilaxia, possivelmente devido a existência de múltiplos fatores que agem nesse ambiente.

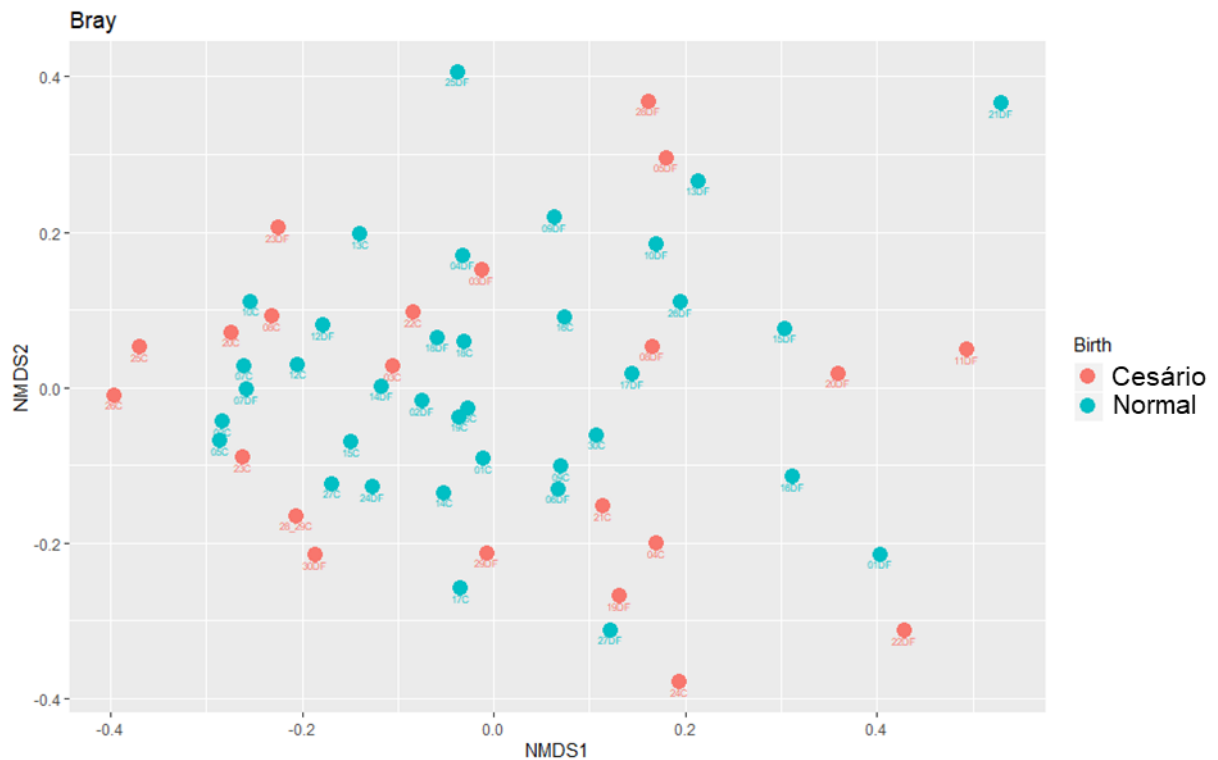


Figura 10- Diversidade beta da microbiota intestinal de crianças com DF em antibioticoprofilaxia crônica e grupo controle nascidos de parto vaginal e cesariano.

Uma maior diversidade bacteriana intestinal aumenta a resiliência do hospedeiro contra agentes patogênicos (MCCANN, 2000; LIN *et al.*, 2013; SOMMER *et al.*, 2017). Segundo Yatsunenko *et al.* (2012), a perda da diversidade genética da microbiota intestinal compromete a abundância de genes envolvidos no metabolismo do hospedeiro e da própria comunidade microbiana. Estudos demonstram que a diversidade bacteriana intestinal reduzida tem sido associada à diversas doenças do sistema imune (WANG *et al.*, 2008; FORNO *et al.*, 2008; ISMAIL *et al.*, 2012; BISGAARD *et al.*, 2011). Pacientes hipertensos e crianças com Transtorno do Espectro Autista- TEA apresentam menor diversidade bacteriana intestinal (ZHAO *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2017). Por outro lado, o aumento desta diversidade em pacientes submetidos a transplantes alogênico de células-tronco hematopoéticas estava associado à melhora da sobrevida global e à redução da mortalidade por não recidiva da doença do enxerto contra o hospedeiro- DECH (TAUR *et al.*, 2014). Segundo Collins e Patterson (2020), a diversidade é um indicador de microbiota saudável e a redundância das vias metabólicas garante a manutenção de funções essenciais em situações de perda de certos táxons por perturbações, demonstrando a importância da manutenção deste sistema para o hospedeiro.

Esses índices de diversidade de microbioma intestinal devem ser avaliados com cautela, levando em consideração a natureza da relação de uma espécie presente, bem como a noção de que táxons com baixa abundância também podem desempenhar funções importantes no contexto de comunidade e de hospedeiro (ARUMUNGA *et al.*, 2011). Assim, faz-se necessária uma avaliação taxonômica que leve em consideração essas inter-relações.

4.2- Composição e Variações Taxonômicas entre DF e CTL

Como já citado, o sequenciamento da região V3-V4 do 16S rRNA identificou OTUs pertencentes a membros dos reinos Bacteria e Archaea. Essa última apresentou 98% da abundância de suas OTUs como pertencente a um único gênero, o *Methanobrevibacter*, com frequência de aproximadamente 43% no grupo com DF e 79% no CTL, abundância inferior a 1% com menor representatividade no DF ($p \leq 0,02$) e maior frequência no CTL ($X^2 = 0,006$). Quando feita análise levando em consideração apenas os indivíduos pareados, a frequência desse gênero no DF e CTL é respectivamente de 33% e 90% com menor abundância relativa para o grupo com DF ($p < 0,0001$).

O gênero *Methanobrevibacter* são arqueias anaeróbias estritas produtoras de metano pela redução do dióxido de carbono via hidrogênio. Dentro desse grupo a *Methanobrevibacter smithii* é a arqueia metanogênica mais comum presente na microbiota intestinal humana, envolvida com maior eficiência no salvamento energético, pois retiram do intestino o excesso de hidrogênio, o qual prejudica a fermentação bacteriana. Por promover maior eficiência na extração energética e consequente ganho de peso, essa espécie de arqueia tem sido alvo terapêutico para tratamento da obesidade (SAMUEL *et al.*, 2007).

Trabalhos envolvendo transplante de fezes demonstraram que doadores magros e saudáveis podem transmitir o fenótipo relacionado a eficiência no salvamento energético devido a composição de sua microbiota intestinal (TURNBAUGH *et al.*, 2006, TURNBAUGH *et al.*, 2008). Segundo Tomas *et al.* (2017), um dos elos que impulsionou a evolução simbiótica entre vertebrados e os microrganismos intestinais foi a extração e o armazenamento de energia. Aqui vale ressaltar que pacientes falciformes apresentam maiores demandas calóricas (BARDEN *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2014) e, portanto, o salvamento energético, promovido pela microbiota intestinal, seria uma via relevante no fornecimento de energia para esse grupo de pacientes.

As análises dos grupos bacterianos em nível taxonômico mais alto, como filo, não apresentaram diferenças estatísticas significantes na abundância relativa entre os grupos DF e CTL, com exceção do filo *Tenericutes*, que apresentou maior abundância relativa no grupo CTL ($p = 0,01$). A maior abundância relativa do filo *Tenericutes* está associada a

microbiota intestinal saudável quando comparados a pacientes com síndrome metabólica (LIM *et al.*, 2017).

Os filos mais abundantes da microbiota intestinal foram *Firmicutes* (72%), *Actinobacteria* (12%), *Bacteroidetes* (11%) e *Proteobacteria* (3%), representando 99% da abundância da microbiota intestinal (Tabela 09 e Figuras 11, 12 e 13). De acordo com teste estatístico de Mann-Whitney, apesar do filo *Actinobacteria* apresentar abundância relativa superior ao *Bacteroidetes* no grupo CTL, não há diferenças significativas na abundância dos respectivos filos, ao contrário do grupo DF onde o teste demonstrou que o percentual do filo *Bacteroidetes* é significativamente superior ao *Actinobacteria* ($p = 0,01$). Esse resultado converge para os dados publicados acerca da composição da microbiota intestinal humana, a qual possui como principais filos, *Firmicutes* (com os gêneros *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*), *Bacteroidetes* (com os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*), *Actinobacteria* (com os gêneros *Colinsella* e *Bifidobacterium*) e *Proteobacteria* (com o gênero *Enterobacter*), além do filo *Verrucomicrobia*, que possui como uma das suas principais espécies, a bactéria degradadora de muco *Akkermansia muciniphila* (ECKBURG, 2005; COLLADO *et al.*, 2007; Consórcio THMP, 2012; HERMANN-BANK *et al.*, 2013; KATES *et al.*, 2020).

Tabela 09 - Distribuição de OTUs nos principais filos bacterianos.

Filos do CTL	%	Filos do DF	%	Média %
CTL <i>Firmicutes</i>	72,0625	DF <i>Firmicutes</i>	71,9632	72,0128
CTL <i>Bacteroidetes</i>	9,4299	DF <i>Bacteroidetes</i>	13,1646	11,2973
CTL <i>Actinobacteria</i>	14,1155	DF <i>Actinobacteria</i>	9,5893	11,8524
CTL <i>Proteobacteria</i>	2,0677	DF <i>Proteobacteria</i>	3,3222	2,695
CTL <i>Verrucomicrobia</i>	0,9902	DF <i>Verrucomicrobia</i>	0,9077	0,949
CTL <i>Tenericutes</i> ($p = 0,01$)*	0,4	DF <i>Tenericutes</i>	0,3	0,35
Total	99,8	Total	99,2	99,5

* Filo com significância estatística ($p \leq 0,05$),

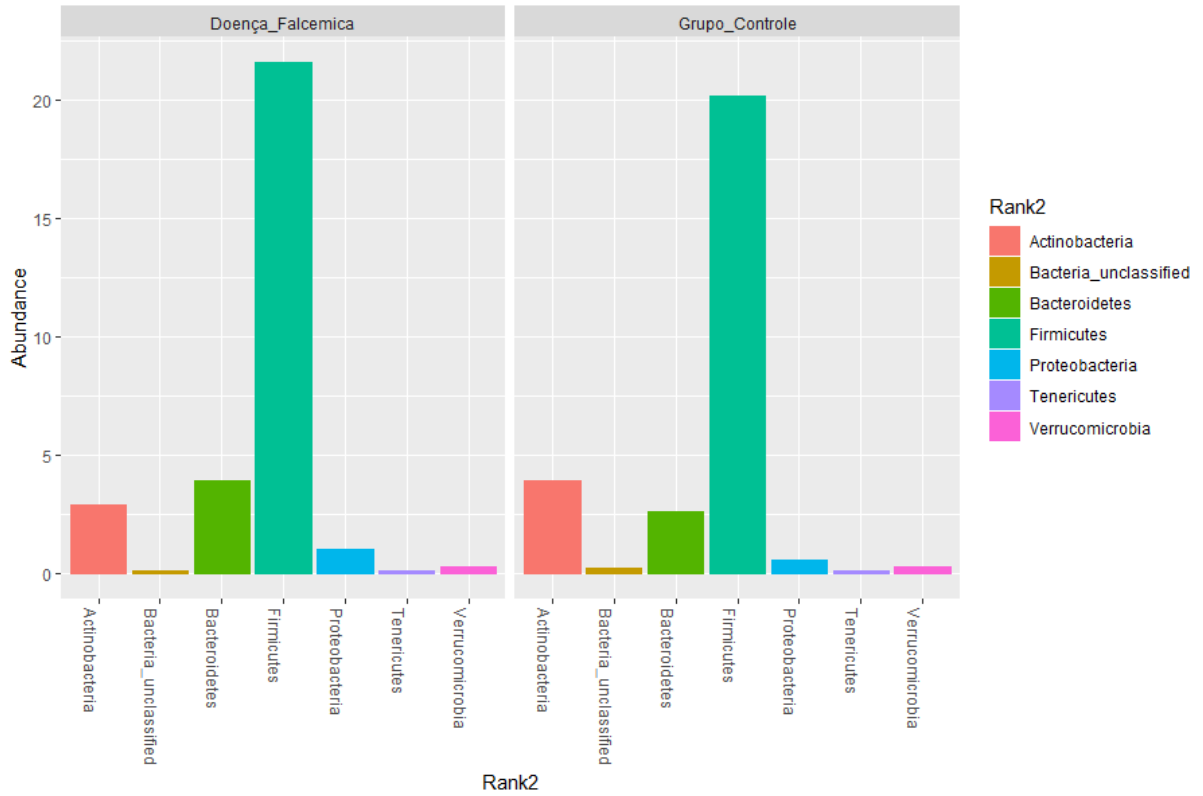


Figura 11- Principais filós encontrados na análise do microbioma em amostras de fezes de crianças com DF e grupo controle.

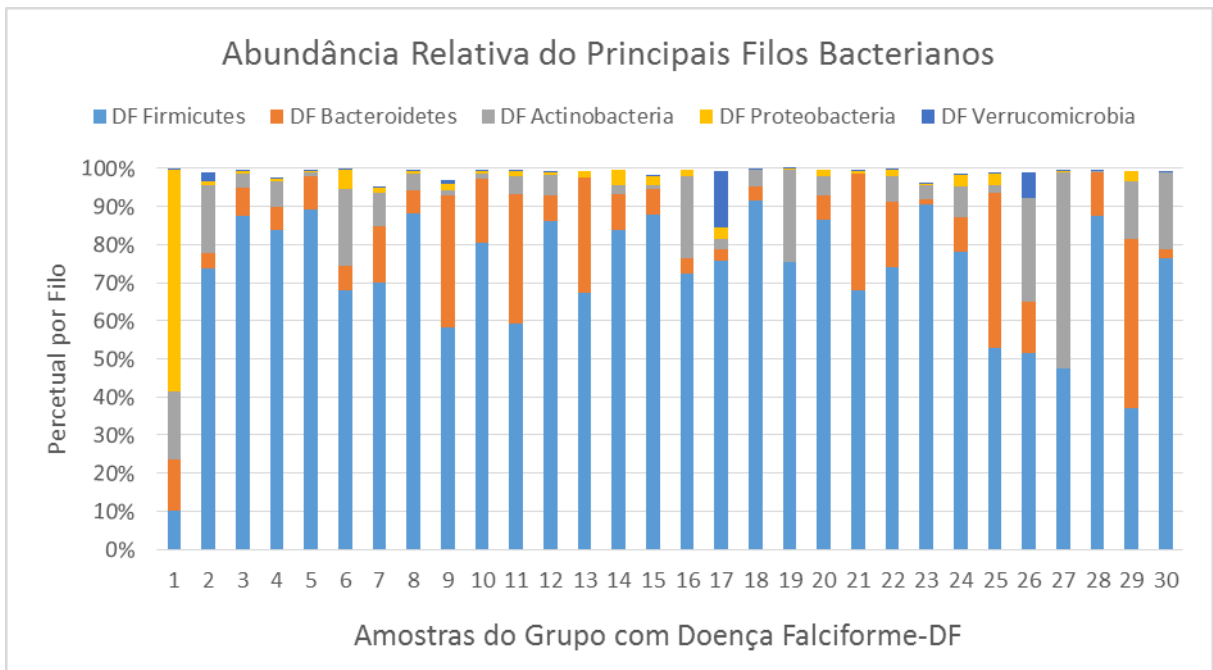


Figura 12- Principais filós encontrados na análise do microbioma a partir de amostras de fezes de crianças com DF.

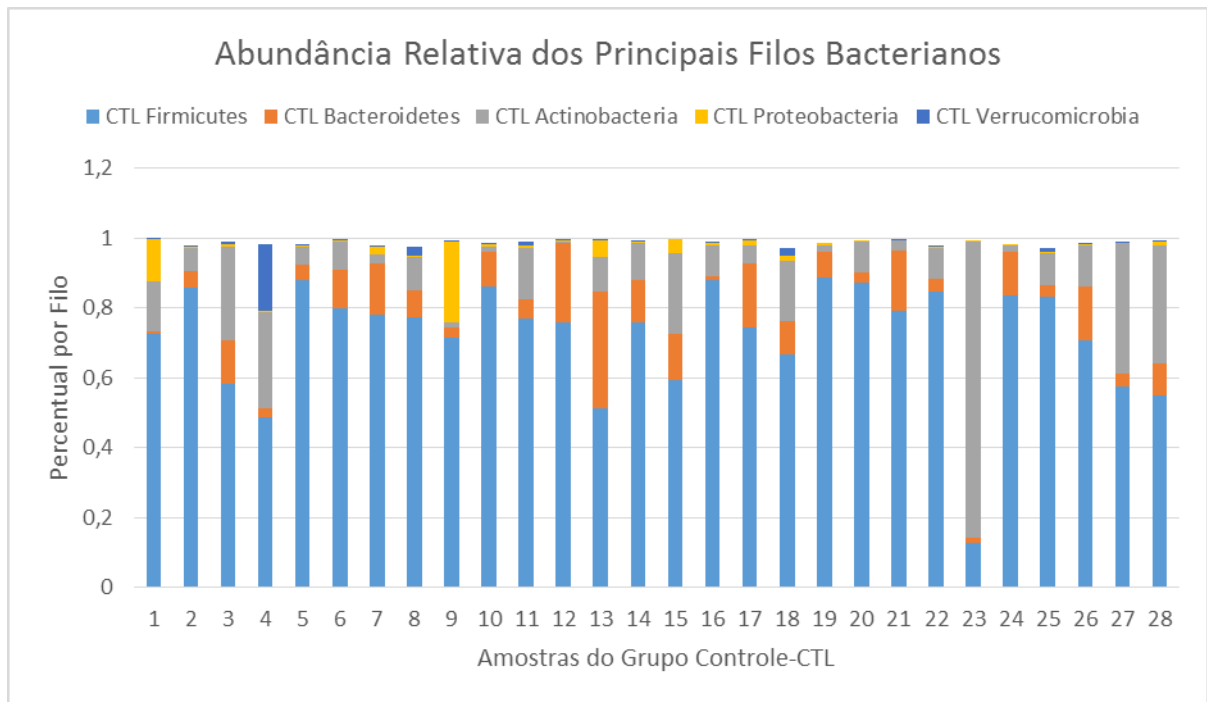


Figura 13- Principais filis encontrados na análise do microbioma a partir de amostras de fezes de crianças do grupo CTL.

4.2.1- Índice de diversidade de Shannon entre filis bacterianos do grupo de criança com DF e grupo CTL.

Analisando os filis mais abundantes com o índice de diversidade de Shannon, o grupo com DF comparado ao grupo controle apresentou menor diversidade em *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* após análise utilizando o teste de Mann Whitney, considerando valor de significância menor que 0,05 ($p < 0,0002$), ($p < 0,001$), ($p = 0,002$), respectivamente.

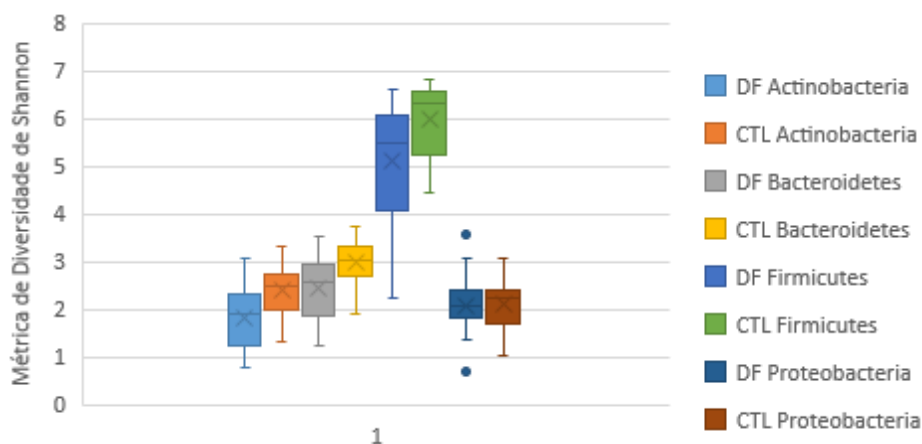


Figura 14- Índice de Diversidade de Shannon (H') entre os quatro filis mais abundantes, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, a partir de amostras de fezes de crianças com DF e grupo controle.

4.2.2- Índice de diversidade de Simpson entre filios bacterianos dos DF e CTL

O índice de diversidade de Simpson invertido demonstrou que o grupo com DF comparado ao grupo controle possuiu menor diversidade de microorganismos dos grupos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, após análise utilizando o teste de Mann Whitney, considerando o valor de significância menor que 0,05 ($p = 0,001$), ($p = 0,002$) e ($p < 0,01$), respectivamente.

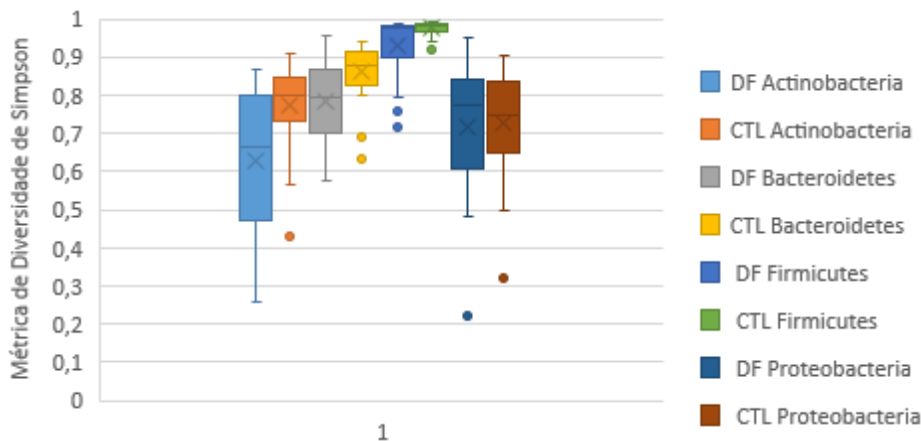


Figura 15- Índice de Diversidade de Simpson (1-D) na comparação dos quatro filios mais abundantes: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, em amostras de fezes de crianças com DF e grupo CTL.

4.2.3- Índice de diversidade de Chao-1 entre os filios bacterianos dos DF e CTL

O índice de diversidade de Chao-1, também demonstrou que o grupo com DF comparado ao grupo controle possuiu menor diversidade de microorganismos de Firmicutes após análise utilizando o teste de Mann Whitney, considerando o valor de significância menor que 0,05 ($p = 0,02$). O filo Proteobacteria não apresentou diferenças significativas para nenhum dos índices de diversidade testados.

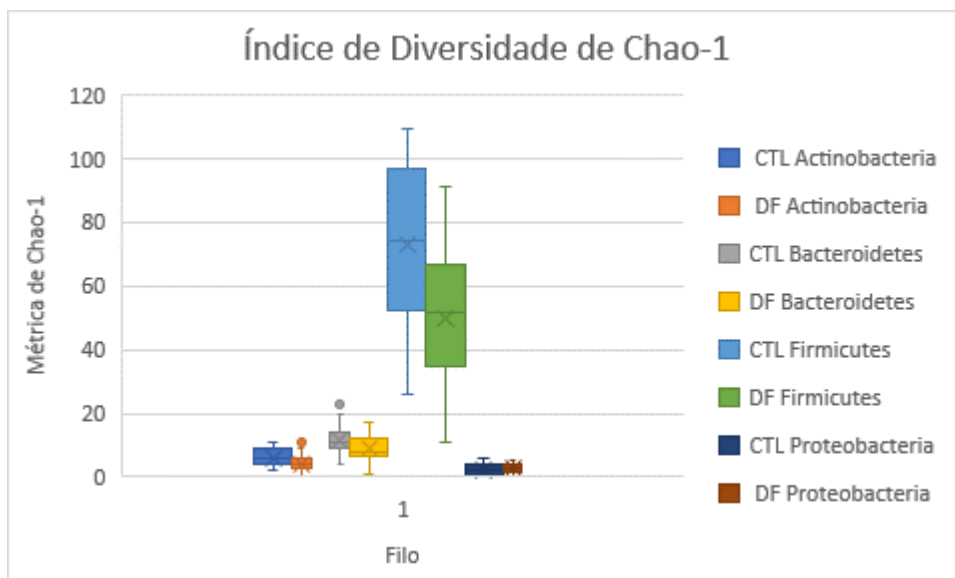


Figura 16- Índice de Diversidade de Chao-1, na comparação dos quatro filos mais abundantes *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, em amostras de fezes de crianças com DF e grupo CTL.

Na avaliação da representatividade dos grupos taxonômicos mais baixos foi possível identificar divergências na abundância relativa das famílias mais presentes, *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Christensenellaceae*, *Coriobacteriaceae* ($p = 0,05$), ($p < 0,04$), ($p < 0,04$), ($p = 0,04$), respectivamente (Tabela 10). Entre as 14 famílias bacterianas mais abundantes, o grupo com DF apresentou menores índices de diversidade em sete: *Bifidobacteriaceae*, *Christensenellaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* e *Ruminococcaceae* ($p < 0,05$); e não apresentaram diferenças significativas para os outros sete grupos: *Akkermansiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Enterococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Streptococcaceae*, *Tannerellaceae* e *Veillonellaceae* quando comparado ao grupo controle.

Tabela 10- Abundância relativa das famílias bacterianas mais frequentes.

Família	Média da Abundância (%)	Família	Média da Abundância (%)
DF <i>Akkermansiaceae</i>	0,9032	CTL <i>Akkermansiaceae</i>	0,983599
DF <i>Bacteroidaceae</i> ($p=0,05$)	7,2688	CTL <i>Bacteroidaceae</i>	2,3826147
DF <i>Bifidobacteriaceae</i>	6,5851	CTL <i>Bifidobacteriaceae</i>	10,1192876
DF <i>Christensenellaceae</i> ($p<0,04$)	0,6625	CTL <i>Christensenellaceae</i>	1,7010885
DF <i>Coriobacteriaceae</i> ($p=0,04$)	2,0177	CTL <i>Coriobacteriaceae</i>	2,6696107
DF <i>Enterobacteriaceae</i> ($p<0,04$)	2,7201	CTL <i>Enterobacteriaceae</i>	1,45441
DF <i>Enterococcaceae</i>	1,0814	CTL <i>Enterococcaceae</i>	2,061937
DF <i>Erysipelotrichaceae</i>	9,7054	CTL <i>Erysipelotrichaceae</i>	9,99397
DF <i>Lachnospiraceae</i>	25,6546	CTL <i>Lachnospiraceae</i>	23,22377
DF <i>Prevotellaceae</i>	3,7408	CTL <i>Prevotellaceae</i>	5,61135
DF <i>Ruminococcaceae</i>	22,8615	CTL <i>Ruminococcaceae</i>	28,03967
DF <i>Streptococcaceae</i>	3,7145	CTL <i>Streptococcaceae</i>	3,105135
DF <i>Tannerellaceae</i>	1,1383	CTL <i>Tannerellaceae</i>	0,3034824
DF <i>Veillonellaceae</i>	6,1553	CTL <i>Veillonellaceae</i>	3,6088592
Total	94,2092	Total	93,1989023

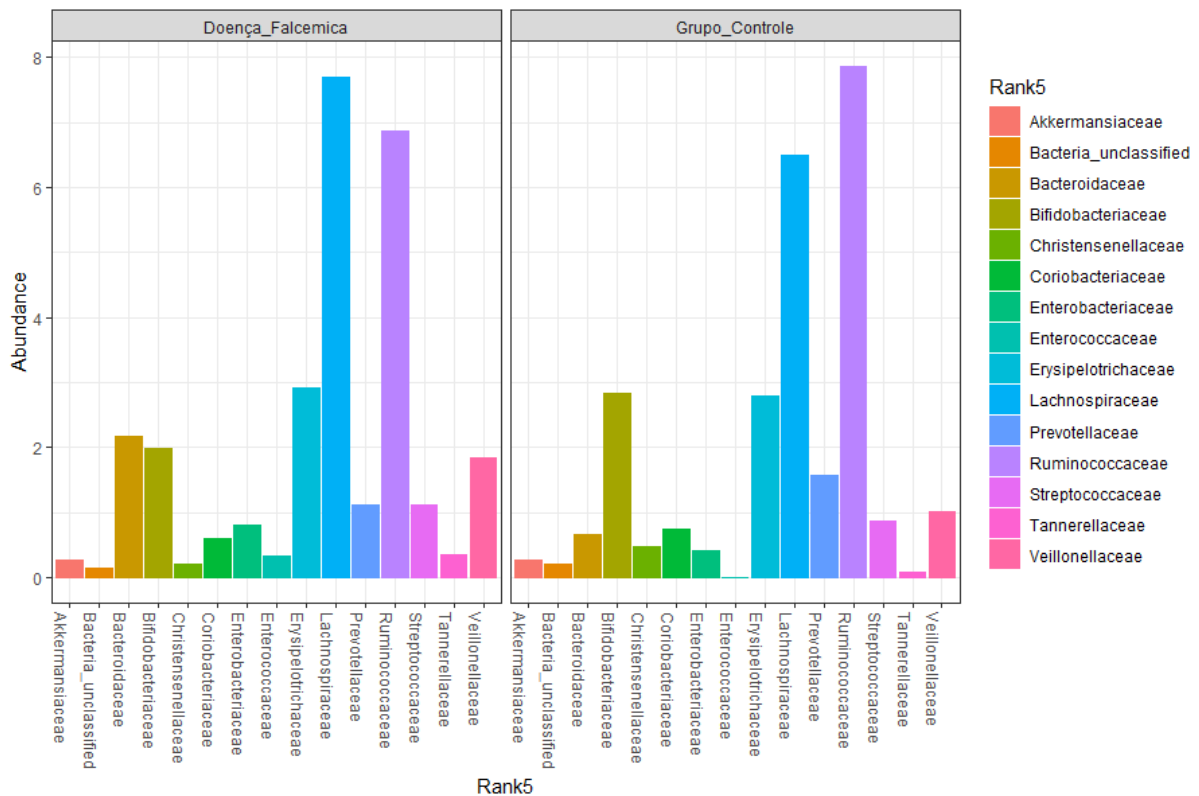


Figura 17- Principais famílias de bactérias encontradas na análise do microbioma a partir de amostras de fezes de crianças com DF em antibioticoprofilaxia e grupo controle.

As bactérias das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* destacam-se por apresentarem média superior a 50% em abundância na microbiota intestinal, porém uma menor riqueza e menor equabilidade de espécies nos pacientes com doença falciforme que participaram do estudo (Tabela 10 e Figura 17). A família *Ruminococcaceae* apresenta função importante na homeostase do hospedeiro, pois neste grupo encontra-se uma das espécies de bactérias comensais mais abundantes da microbiota intestinal humana de indivíduos saudáveis, *Faecalibacterium prausnitzii*, bactéria Gram-positivo, anaeróbia, produtora de butirato e outros ácidos graxos de cadeia curta (SUAU *et al.*, 2001). Essa bactéria apresenta-se deficiente em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e em diversas doenças inflamatórias intestinais, incluindo a doença de Crohn (KAMEYAMA e ITOH, 2014; SOKOL *et al.*, 2009). Recentemente *F. prausnitzii* foi associada a inibição da interleucina-17 e com a produção de uma molécula anti-inflamatória microbiana (MAM) de 15 kDa capaz de inibir a via NF- κ B nas células epiteliais intestinais e prevenir a colite (QUÉVRAIN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014; SOKOL *et al.*, 2008).

A família *Lachnospiraceae* representou 88% dos táxons como inclassificáveis para gênero e espécie em ambos os grupos. Apesar da baixa resolução na identificação dos membros dessa família, foram identificadas divergências na abundância relativa de membros importantes dessa família de bactérias como *Coprococcus*, *Fusicatenibacter* e

Blautia (Tabela 12). Com destaque para esse último, que apresentou maior abundância no grupo de crianças com DF comparado ao controle e o seu aumento está relacionado a diminuição da morbimortalidade pela Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro - DECH (JENQ *et al.*, 2015), a qual apresenta importante relação com a doença falciforme visto que o transplante de medula e as constantes transfusões de sangue fazem parte da realidade terapêutica e curativa desses pacientes (BRASIL-MS, 2018).

Uma das estratégias para prevenção da DECH é realizar procedimentos terapêuticos de supressão imunológica, porém, essa prática pode agravar ainda mais a imunodeficiência das pessoas que vivem com a DF. Estratégias que possam diminuir a DECH, e preservar a função imunológica podem melhorar significativamente a terapia do transplante (JENQ *et al.*, 2015). Assim, a abundância do gênero *Blautia* surge como possível estratégia de marcador clínico para esse grupo de pacientes, que possuem risco aumentado em desenvolver a DECH, pois a única estratégia de cura até o momento é o transplante de células troncos hematopoéticas (BRASIL-MS, 2018).

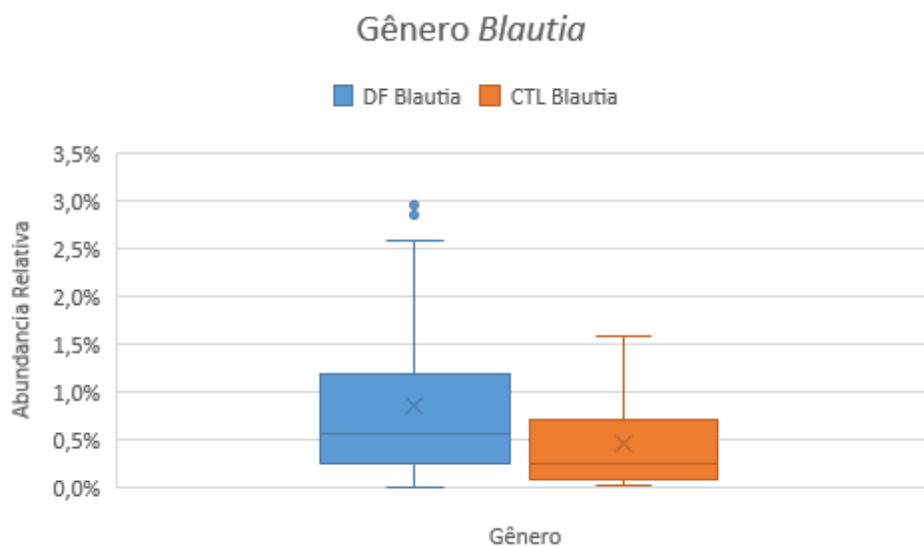


Figura 18- Abundância relativa do gênero *Blautia* no microbioma de amostras fecal de crianças com DF e grupo CTL.

Lachnospiraceae também aparece em destaque com relação a homeostase do hospedeiro. Segundo Meehan e Beiko (2014), essa família possui abundância relativa superior a 10%, com maiores proporções com o avançar da idade. São bactérias anaeróbias estritas, produtores de AGCC como butirato e propionato. A produção desses AGCC pela microbiota intestinal promove a diminuição do pH do intestino, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas e melhorando a absorção dos nutrientes. Os AGCC estão relacionados com aumento de expressão das proteínas das junções firmes, produção de muco, proliferação de enterócitos, combate ao câncer colorretal, interfere no metabolismo

energético através da síntese de incretinas intestinais e produção de energia (RÍOS-COVIÁN *et al.*, 2016).

Assim, bactérias produtoras de butirato como *Lachnospiraceae* destacam-se pelo efeito amplo na saúde humana. Em nível intestinal, o butirato melhora o transporte de fluídos, protege a mucosa contra inflamação e estresse oxidativo, reforça a barreira de defesa epitelial, melhora a motilidade intestinal, a absorção iônica e a proliferação celular (CANANI *et al.*, 2011). Em nível extra-intestinal, o butirato tem efeitos benéficos nas hemoglobinopatias estruturais, a exemplo das doenças falciformes, as hemoglobinopatias de síntese como na talassemia beta ou mesmo nas duplas heterozigoses, pois induzem o aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF), principalmente pela inibição da enzima histona deacetilase, causando efeito global de hiperacetilação de histonas com consequente aumento da expressão do gene da γ -globina (WEINBERG *et al.*, 2005; FATHALLAH *et al.*, 2007). Além disso, o butirato tem efeitos positivos em outras doenças genéticas, metabólicas, hipercolesterolemia, resistência à insulina e acidente vascular cerebral isquêmico (CANANI *et al.*, 2012).

A família *Christensenellaceae* apresentou menor abundância no grupo com DF (0,7%) quando comparado ao grupo controle (1,17%). Utilizando o teste de Mann Whitney e considerando o valor de significância estatística menor que 0,05, estes resultados demonstraram que houve diferenças significantes ($p = 0,04$). Além da menor abundância houve também uma menor frequência da família *Christensenellaceae* nas amostras de fezes obtidas do grupo de crianças com DF ($X^2 = 0,02$) comparado com os resultados encontrados nas amostras das crianças do grupo controle. Todas as amostras do grupo de crianças com DF sem *Christensenellaceae* também estavam negativas para *Methanobrevibacter*. A *Christensenellaceae* teve seu primeiro membro identificado no ano de 2012, denominado como *C. minuta* (MOROTOMI *et al.*, 2012), e o genoma completo do microorganismo foi publicado em 2017 (ROSA *et al.*, 2017), portanto um táxon recentemente descrito, pertencente ao filo *Firmicutes*, tem emergido como marcador importante de microbiota saudável. Segundo Goodrich *et al.* (2014) a abundância média esperada para essa família é de 0,01%.

Algumas publicações já demonstraram que a representatividade da família *Christensenellaceae* na composição da microbiota intestinal humana está inversamente relacionada ao índice de massa corporal (IMC) e as mais diversas condições de saúde do hospedeiro, o que permite a sua utilização com foco terapêutico (WATERS e LEY, 2019). A família *Christensenellaceae* constitui o centro de uma rede de co-ocorrência positiva com outros táxons, incluindo arqueias metanogênicas da família *Methanobacteriaceae* (GOODRICH *et al.*, 2014). Apresenta-se como o elo microbiano mais robusto e concreto

relacionado ao IMC e doenças inflamatórias intestinais, é um táxon fortemente herdável, com abundância relacionada ao sexo e etnia (WATERS e LEY, 2019).

As famílias de bactérias Gram-negativo identificadas neste trabalho como as mais abundantes nos grupos de crianças com doença falciforme e controle foram *Akkermansiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Christensenellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Veillonellaceae* e *Tannerellaceae*. A abundância dessas famílias encontradas nas amostras de fezes no grupo de crianças com DF foi superior quando comparado ao grupo controle (Tabela 10 e Figura 16), exceto as *Akkermansiaceae*, *Veillonellaceae* e *Tannerellaceae* que apesar de apresentarem uma média superior na abundância relativa nas amostras provenientes do grupo de crianças com DF, não houve diferenças significativas e a *Christensenellaceae* que foi mais abundante no CTL ($p = 0,04$). Nesse grupo, *Enterobacteriaceae* é a família de bactérias Gram-negativo com destaque pelo potencial patogênico dos seus membros (HU *et al.*, 2013, LI *et al.*, 2014). Segundo Shelton e Byndloss (2020), a expansão de *Enterobacteriaceae* associada à disbiose pode ser vista como uma assinatura microbiana da disfunção epitelial intestinal e podem desempenhar o papel mais importante em diferentes modelos de doenças não transmissíveis (DNTs). Uma possível consequência no aumento da abundância de *Enterobacteriaceae* é a ampliação do resistoma, pois seus genomas contêm número elevado de genes de resistência a antibióticos (HU *et al.*, 2013, LI *et al.*, 2014). Este fato associado ao período de exposição crônica aos antibióticos do paciente com DF, até os cinco anos de vida principalmente, faria desse grupo de pessoas um potencial reservatório de genes de resistência, considerando a maior pressão de seleção imposta pela mudança de ambiente com o uso contínuo das drogas.

Uma característica marcante das bactérias Gram-negativo é presença do LPS na composição de suas membranas externas. Essa endotoxina é considerada o principal fator de virulência nas infecções e nas inflamações sistêmicas. Os LPS são liberados principalmente quando da morte dessa célula ou durante a sua divisão (CRUZ-MACHADO, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Apesar desse estudo não ter sido projetado para avaliar a permeabilidade intestinal ao LPS, é possível presumir que os seus níveis estão aumentados no lúmen intestinal de crianças com DF, e que situações que alterem a permeabilidade intestinal dessas crianças, podem ser um fator agravante na patogênese da doença falciforme, uma vez que o LPS é um dos principais gatilhos da resposta inflamatória (CRUZ-MACHADO, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Tabela 11 - Principais filos e famílias encontradas nos grupos avaliados com sua respectiva classificação colorimétrica.

Filo	Família	Coloração
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	Gram-negativo
	<i>Tannerellaceae</i>	Gram-negativo
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	Gram-positivo
	<i>Coriobacteriaceae</i>	Gram-positivo
<i>Firmicutes</i>	<i>Christensenellaceae</i>	Gram-negativo/ Gram-positivo
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	Gram-positivo
	<i>Lachnospiraceae</i>	Gram-positivo
	<i>Ruminococcaceae</i>	Gram-positivo
	<i>Streptococcaceae</i>	Gram-positivo
	<i>Veillonellaceae</i>	Gram-negativo
	<i>Enterococcaceae</i>	Gram-positivo
<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Gram-negativo
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Akkermansiaceae</i>	Gram-negativo

Sabe-se que em situações de disbiose intestinal ocorre a diminuição da síntese de muco e de fatores de adesão entre os enterócitos. Este é principal fator responsável pelo aumento da permeabilidade intestinal, facilitando a absorção do LPS (RAETZ e WHITFIELD, 2002; ARRIETA *et al.*, 2006; SUZUKI, 2013; RIOS-COVIAN *et al.*, 2016). O LPS é um padrão molecular associado a patógeno (PAMP) que estimula os Receptores de Reconhecimento de Padrão – PRR, como TLR e NLRP, os quais fazem a célula liberar citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina-1 β , Interleucina-18, Fator de Necrose Tumoral e a ativação do NF κ B (CRUZ-MACHADO, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Vários estudos têm correlacionado essa condição inflamatória ao surgimento de doenças como diabetes, cardiopatias, neuroses etc. (ALMEIDA *et al.* 2009; VAMANU *et al.*, 2016; LACHA *et al.* 2017). Em pacientes com a doença falciforme, esses mediadores inflamatórios já foram relatados como responsáveis por participarem e exacerbarem as crises vaso-oclusivas mediante aumento de fatores de adesão celular e pro-coagulantes (ZAGO *et al.*, 2007; CANÇADO *et al.*, 2009; MANFREDINI *et al.*, 2017). Segundo Zhang *et al.* (2015), a depreciação da microbiota intestinal por antibiótico de amplo espectro reduz significativamente os níveis de neutrófilos envelhecidos, os quais através da integrina mac-1 adere-se a plaquetas e eritrócitos, agindo como núcleo da crise vaso-oclusiva (HIDALGO *et al.*, 2009), assim, segundo esse mesmo autor o fornecimento de LPS por sonda gástrica

restabele completamente o número desses polimorfonucleados senescentes. Desta forma, o LPS exerce papel importante nas complicações das crises falciformes.

Associado à informação de que o LPS eleva os níveis de fatores de adesão das células sanguíneas e endoteliais, Dutra *et al.* (2014) identificaram que o grupo heme da hemoglobina ativava macrófagos previamente sensibilizados com LPS através de receptores NLRP3, com formação do inflamassoma e consequente aumento da IL-1 β . Portanto, trata-se de uma informação relevante, visto que pacientes com DF apresentam níveis elevados de grupo heme circulante em função da anemia hemolítica constante, característica patognômica da doença (DINARELLO, 2006).

O LPS também é responsável pelo aumento do cortisol ao ativar o inflamassoma, com consequente elevação da IL-1 β (DENIPOTE, 2010; DAVIS, *et al.*, 2011; STROWIG, *et al.*, 2012). A IL-1 β , além de desempenhar função pirógena no hipotálamo, regula a sua própria produção através de feedback negativo. A IL-1 β estimula o hipotálamo a secretar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) que estimula a hipófise anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que por sua vez, estimula o córtex adrenal a produzir glicocorticosteróides que inibirão a síntese primária de pró-IL-1 β (VARELLA e FORTE, 2001). A existência de uma relação entre os níveis de cortisol e a microbiota já havia sido relatada por Carabotti (2015), que utilizando modelos experimentais com ratos isentos de germes demonstrou que os animais apresentavam respostas exacerbadas frente a situações de estresse e que tais respostas se normalizavam após serem colonizados com uma microbiota intestinal saudável. Ele demonstrou também que a recuperação da resposta ao estresse só ocorria se a colonização do intestino fosse em fases iniciais do desenvolvimento e, portanto, depois de certa idade não era mais possível reverter o padrão exacerbado de resposta ao estresse.

E por fim, o LPS possui ação inibitória do complexo motor migratório (CMM) que ocasiona estase do conteúdo luminal, favorecendo o aumento do crescimento bacteriano (DONOWITZ e PETRI, 2015), o que pode justificar o maior percentual de distúrbios intestinais encontrados no grupo de crianças com DF comparado ao grupo controle no presente estudo (Tabela 06).

A microbiota intestinal tem sido associada a diversas doenças, mas a maioria dos componentes específicos dessa relação ainda continuam desconhecidos. Assim, ao invés da simples prospecção da microbiota intestinal, a avaliação de determinados táxons e suas vias metabólicas, bem como suas interações com a saúde do hospedeiro passou a ser um passo importante na instituição de terapêuticas microbianas baseadas em evidências (PROCTOR, 2019; iHMP, 2019).

Ao analisar a composição da microbiota intestinal em nível de gênero, que geralmente é o nível mais específico no qual o sequenciamento em larga escala do gene

16S rRNA fornece classificação confiável, em ambos os grupos estudados foram identificados 74 grupos taxonômicos que representam respectivamente no DF e no CTL 88,5% e 87,9% da abundância microbiana (Tabela 12). Desses táxons, 54% (40) apresentaram diferenças significativas na abundância relativa quando aplicado o teste estatístico de Mann-Whitney. E em ambos os grupos, menos de 15 táxons concentraram aproximadamente 77% da abundância microbiana intestinal (Tabela 13). Vale ressaltar que em ambos os grupos estudados o táxon mais representativo foi *Lachnospiraceae* sem classificação, mostrando que a metodologia utilizada não identificou, no nível de gênero, 88% das OTUs dessa família.

Segundo Wang *et al.* (2020), pacientes recuperados da tuberculose causada por bactérias multirresistentes (TB-MDR) após tratamento por mais de 20 meses, tiveram a abundância de 58 gêneros bacterianos alteradas significativamente, bem como a diminuição de 16% da sua riqueza, e que a microbiota intestinal ainda exibia uma composição taxonômica alterada após três a oito anos da recuperação e a interrupção do tratamento, em comparação com a microbiota intestinal antes do tratamento.

Dentro desse grupo de 42 táxons divergentes na abundância relativa, destacamos os considerados enterótipos (*Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*), pois, segundo Arumugam *et al.* (2011), esses são núcleos microbianos comuns importantes que mantém correlações positiva e negativa com vários outros gêneros, desempenhando dessa forma papel relevante na composição da microbiota intestinal.

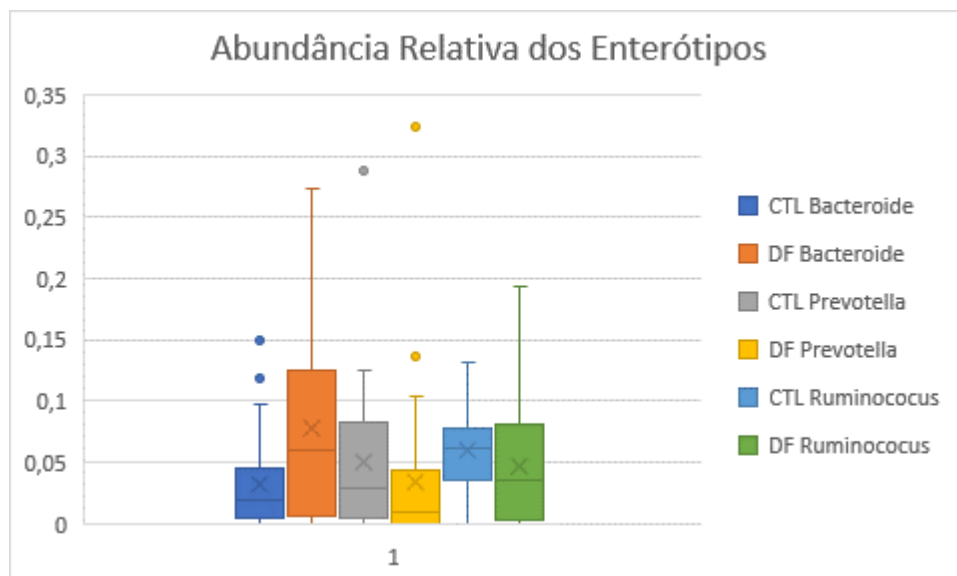


Figura 19- Abundância relativa dos enterótipos (*Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*) no microbioma fecal do grupo de crianças com DF e grupo CTL.

Ao analisar a abundância relativa entre os enterótipos, *Bacteroides* foi mais representativo no grupo de crianças com DF (7,3%) quando comparado ao grupo controle (2,4%) ($p = 0,05$). Enquanto as comparações dos enterótipos *Prevotella* e *Ruminococcus* entre o grupo de crianças com DF e o grupo controle, apesar de menor média na AR não apresentaram diferenças estatísticas ($p = 0,07$) e ($p = 0,06$) respectivamente, considerando as análises pelo teste de Mann Whitney (Tabela 12).

Quando aplicado os principais índices de análise de diversidade biológica (Shannon, Simpson e Chao-1), *Prevotella* e *Ruminococcus* foram menos diversos no grupo de crianças com DF comparado ao grupo controle, $p = 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente. Enquanto *Bacteroides*, apesar da diferença na abundância relativa, não apresentou diferenças significativas para os índices de diversidade aplicados.

O gênero *Bacteroides* apresentou uma abundância relativa de 7,3% no grupo de crianças com DF e 2,4% no grupo CTL ($p = 0,05$). Esse táxon é formado por bactérias Gram-negativo, anaeróbias, em formato de bacilo, que geralmente mantém relação benéfica com o hospedeiro quando retidas no intestino, porém quando fora dele podem causar bacteremia e abscessos em vários órgãos. Possuem capacidade elevada de adaptar-se às tensões ambientais, são resistentes a bile, possui um complexo sistema de identificação e adaptação a disponibilidade de nutrientes, além de múltiplas bombas de extrusão de xenobióticos e mecanismos de controle para outros microorganismos concorrentes. Com isso, entre todos os patógenos anaeróbicos, possuem uma das maiores taxas de resistência a antibióticos, e são responsáveis por índices de mortalidade de mais de 19% (WEXLER, 2007).

Duas espécies importantes no grupo *Bacteroides* são *B. thetaiotaomicron* e *B. fragilis*. A primeira espécie é capaz de aumentar 52 vezes a síntese de RegIIIy (uma lectina do tipo C, secretada pelas células de Paneth), que é capaz de aderir aos peptidoglicanos das bactérias Gram-positivo causando danos na parede celular e vazamento citoplasmático com consequente morte bacteriana (CASH *et al.*, 2006). A microbiota aumenta 20 vezes a expressão de RegIIIy e a sua concentração é crescente ao longo do TGI, devido a concentrações microbianas aumentadas em direção ao colón (CASH *et al.*, 2006).

O gênero *Prevotella* apresentou abundância de 3,1% e 3,9% nas amostras de fezes provenientes do grupo de crianças com DF e grupo CTL, respectivamente (Tabela 12). Esse táxon, além da sua classificação como enterótipo (ARUMUGAM *et al.*, 2011), tem sido utilizado como biomarcador da dieta (GORVITOVSKAIA *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2018), pois possuem a habilidade de degradar carboidratos não digeríveis, como xilano e de outros polissacarídeos fibrosos (DODD *et al.*, 2011) sendo por isso prevalente em populações com dieta vegana ou vegetariana (De FILIPPIS *et al.*, 2016; GORVITOVSKAIA *et al.*, 2016; SHANKAR *et al.*, 2017). Esse gênero tem apresentado correlação positiva e negativa com

outros gêneros e assim desempenhando papel relevante na estrutura da comunidade microbiana intestinal (ARUMUGAM *et al.*, 2011; JAIN *et al.*, 2018). Prevalente em mucosas, é o gênero mais abundante no sistema respiratório. É composto por bactérias anaeróbias, Gram-negativo, classificadas como comensais devido a presença frequente em indivíduos saudáveis, e raramente algumas cepas são descritas como causadoras de infecções oportunistas. Pertencente ao filo *Bacteroidetes*, este gênero tem emergido como causador de periodontite e como regulador da artrite reumatoide (LARSEN, 2017; KAZEMTABRIZI *et al.*, 2020). Segundo Ren *et al.* (2020), variações na abundância de *Prevotella* em conjunto com outros gêneros, está relacionado com eventos de pneumonia em crianças menores de cinco anos.

Segundo Gorvitovskaia *et al.* (2016), *Prevotella* e *Bacteroides* são os táxons que mais contribuem para dissimilaridade entre amostras, sendo as suas frequências inversamente proporcionais. De acordo com Jain *et al.* (2018), *Prevotella* apresenta correlação positiva com os gêneros *Catenibacterium*, *Megasphaera*, *Mitsuokella*, *Faecalibacterium*, *Dialister*, *Lactobacillus* e correlação negativa com *Ruminococcus*, *Blautia*, *Dorea*, *Megamonas* e *Bacteroides*. Assim, os resultados encontrados neste trabalho e apresentados na Tabela 12, corroboram com os dados referenciados, com exceção dos gêneros *Megasphaera*, *Faecalibacterium* e *Dorea*, que não apresentaram diferenças estatísticas na abundância entre as amostras fecais oriundas dos grupos de crianças com DF e CTL, e o gênero *Lactobacillus*, que apesar da diferença significativa entre os grupos (0,5% e 0,2%, respectivamente) foi mais abundante no grupo com DF, que possui menor abundância de *Prevotella*. Rigottier-Gois (2013) identificou o aumento de *Lactobacillus* em Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), sugerindo que isso decorre da adaptação do organismo para mitigar o processo inflamatório.

O gênero *Ruminococcus* apresentou abundância de 2% e 3% nas amostras de fezes obtidas dos grupos com DF e CTL, respectivamente (Tabela 12). Esse gênero constitui um grupo importante de simbiontes microbianos intestinais, que foi originalmente isolado do rúmen de bovinos. Atualmente, já foi identificada no trato TGI de diversas espécies de ruminantes e de não ruminantes. São bactérias em forma de cocos, estritamente anaeróbicas, Gram-positivos, não móveis e todas precisam de carboidratos fermentáveis para crescerem, e por isso, há evidências de que os *Ruminococcus* estão predominantemente associados a herbívoros e onívoros, sendo poucas espécies não associadas a um hospedeiro (RAINEY, 2009; ZE *et al.*, 2012; LA REAU *et al.*, 2016). A abundância de determinadas espécies de *Ruminococcus* em seres humanos demonstrou ser estimulada por dieta rica em amido WALKER *et al.*, 2011). Existem poucas espécies descritas até o momento (LA REAU *et al.*, 2016) e *Ruminococcus champanellensis* é a única

espécie bacteriana conhecida, já isolada do cólon humano e capaz de degradar a celulose cristalina (MORAIS *et al.*, 2016).

Outras espécies de *Ruminococcus* associadas a microbiota intestinal humana, como o *R. gnavus* que é encontrado em 90% das pessoas, podem estar associadas ao aumento de doenças inflamatórias intestinais- DII (HALL *et al.*, 2017), pois segundo Henke *et al.* (2019) essa espécie possui um polissacarídeo com potencial inflamatório que induz as células dendríticas a produzirem citocinas, como o TNF α . Essa espécie pode utilizar a mucina como fonte de carbono e conseqüentemente comprometer a permeabilidade intestinal (PNG *et al.*, 2010; CROST *et al.*, 2013). A abundância aumentada tem sido relacionada ao transtorno do déficit de atenção e a hiperatividade em crianças (WAN *et al.*, 2020). O aumento da abundância de *R. gnavus* pode ser usado como um biomarcador no surgimento de cálculos biliares (WANG *et al.*, 2020), sendo um núcleo importante de estudo na patogênese da litíase biliar em pacientes com a DF, considerando que a incidência de colelitíase nesses pacientes alcança 40% entre adolescentes e 60% entre adultos (ATHANASSIOU-METAXA *et al.*, 2002).

Tabela 12- Abundância relativa de 74 gêneros mais representativos no microbioma fecal de provenientes dos grupos de crianças com DF e CTL.

Principais Gêneros Bacterianos	Média AR CTL (%)	Média AR DF (%)
<i>Actinomyces</i>	0,054	0,03
<i>Akkermansia</i>	0,9836	0,9032
<i>Alistipes</i>	0,2299	0,2779
<i>Alloprevotella</i>	0,7615	0,194
<i>Bacteroides</i> ($p=0,05$)*	2,3826	7,2688
<i>Barnesiella</i> ($p=0,002$)*	0,0711	0,0259
<i>Bifidobacterium</i>	9,2106	6,3675
<i>Blautia</i> ($p=0,04$)*	0,4564	0,8707
<i>Butyricoccus</i>	0,5329	0,4318
<i>Butyricimonas</i>	0,0286	0,0193
<i>Butyrivibrio</i>	0,1957	0,1704
<i>Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio</i>	0,2055	0,1825
<i>Catenibacterium</i> ($p=0,07$)**	3,5656	2,8943
<i>Christensenellaceae_R-7_group</i> ($p=0,008$)*	0,9065	0,4594
<i>Collinsella</i> ($P=0,05$)*	2,5403	1,9422
<i>Coprococcus</i> ($p=0,02$)*	0,3206	0,2619
<i>Desulfovibrio</i> ($p=0,005$)*	0,1191	0,0524
<i>Dialister</i> ($p=0,03$)*	2,9841	1,4341
<i>Dorea</i>	0,3844	0,4191
<i>Enterorhabdus</i> ($p=0,03$)*	0,0712	0,0348
<i>Erysipelatoclostridium</i> ($p=0,002$)*	0,3465	0,8909
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,8913	1,6735
<i>Faecalibacterium</i>	10,2738	8,1898
<i>Flavonifractor</i>	0,1143	0,1797

<i>Fournierella</i> ($p=0,01$)*	0,0456	0,0092
<i>Fusicatenibacter</i> ($p=0,04$)*	0,1934	0,1192
<i>Holdemanella</i> ($p=0,005$)*	4,9759	3,0895
<i>Klebsiella</i> ($p=0,03$)*	0,2143	0,3709
<i>Lachnospira</i>	0,3661	0,4216
<i>Lachnospiraceae</i> _UCG-003 ($p=0,02$)*	0,0922	0,0606
<i>Lachnospiraceae</i> _UCG-010 ($p=0,004$)*	0,1031	0,0819
<i>Lachnospiraceae</i> _unclassified	20,51	22,6853
<i>Lactobacillus</i> ($p=0,03$)*	0,2089	0,4923
<i>Libanicoccus</i> ($p=0,02$)*	0,1387	0,0413
<i>Megaesphaera</i>	0,1043	0,184
<i>Megamonas</i> ($p=0,03$)*	0,1461	4,2953
<i>Mitsuokella</i> ($p=0,006$)*	0,2371	0,0031
<i>Odoribacter</i>	0,0218	0,0108
<i>Oscillibacter</i> ($p=0,004$)*	0,0163	0,00428
<i>Oxalobacter</i> ($p=0,001$)*	0,0128	0,00303
<i>Parabacteroides</i>	0,2782	1,1214
<i>Peptococcus</i> ($p=0,01$)*	0,0321	0,00661
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,2371	0,2191
<i>Prevotella</i> ($p=0,04$)*	3,9402	3,1562
<i>Rikenellaceae</i> _RC9_gut_group ($p=0,03$)*	0,1576	0,2192
<i>Roseburia</i>	0,0449	0,0609
<i>Rothia</i> ($p=0,02$)*	0,0204	0,0402
<i>Ruminiclostridium</i> _5 ($p=0,04$)*	0,2308	0,2193
<i>Ruminiclostridium</i> _6	0,1225	0,2169
<i>Ruminiclostridium</i> _9	0,0225	0,114
<i>Ruminococcaceae</i> _ge ($p=0,002$)*	2,654	1,5194
<i>Ruminococcaceae</i> _NK4A214_group ($p=<0,0001$)*	0,2132	0,0673
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-0010 ($p=0,001$)*	0,2118	0,0716
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-0013	0,4125	0,4151
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-0014 ($p=0,05$)*	1,3259	0,8662
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-002 ($p=0,001$)*	1,3023	0,633
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-003 ($p=0,01$)*	0,0605	0,0242
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-004	0,0388	0,0506
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-005 ($p=0,002$)*	0,6998	0,2864
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-008	0,0142	0,00283
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-009	0,0271	0,0145
<i>Ruminococcus</i> 1 ($p<0,02$)*	0,666	0,4802
<i>Ruminococcus</i> 2	2,4217	1,6599
<i>Senegalimassilia</i> ($p=0,02$)*	0,1974	0,1181
<i>Slackia</i> ($p=0,01$)*	0,0658	0,0604
<i>Solobacterium</i> ($p=0,001$)*	0,1832	0,00494
<i>Streptococcus</i>	3,0035	3,634
<i>Subdoligranulum</i>	3,641	5,3018
<i>Sutterella</i>	0,0599	0,0469
<i>Tyzzereella</i>	0,4641	0,3415
<i>UBA1819</i>	0,0796	0,1488
<i>Veillonella</i>	0,0653	0,2008

<i>Eggerthella</i> ($p < 0,001$)*	0,0262	0,1231
<i>Hungatella</i> ($p < 0,0005$)*	0,00483	0,0536
Total	87,941	88,545

* Gêneros com significância estatística ($p \leq 0,05$).

Destaca-se também, as divergências na abundância dos gêneros *Barnesiella*, *Ruminococcaceae* UCG-005, *Christensenellaceae* R-7grupo e *Lactobacillus* nos grupos de crianças com DF e CTL (Tabela 12). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os resultados publicados por Mancabelli *et al.* (2017), que realizaram estudo de metanálise a partir de 24 publicações, envolvendo 3048 conjuntos de dados metagenômicos públicos, constituído por 1252 controles e 1796 pacientes, para identificar biomarcadores bacterianos associados a doenças intestinais. Essa metanálise demonstrou que indivíduos saudáveis, grupo controle, apresentavam maior abundância dos gêneros *Barnesiella*, *Ruminococcaceae* UCG-005, *Christensenellaceae* R-7grupo e *Alistipes*, enquanto os pacientes com doenças intestinais apresentavam maior abundância de membros sem classificação da família *Erysipelotrichaceae*, bem como dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* (MANCABELLI *et al.*, 2017). Os resultados aqui encontrados divergiram nos gêneros *Alistipes* e *Streptococcus* que não apresentam diferenças significativas e a família *Erysipelotrichaceae* que apesar de apresentar divergência na abundância dos gêneros *Catenibacterium*, *Holdemanella*, *Solobacterium* e *Erysipelatoclostridium*, apenas esse último apresentou maior abundância no grupo com DF (Tabela 12).

A somatória dos grupos taxonômicos, em nível de gênero, que apresentaram algum grau de diferença significativa nas amostras de fezes oriundas das crianças com DF e grupo CTL foram 34,3% e 34,7%, respectivamente. Esses dados convergem com os resultados de outras publicações que demonstraram que o uso de antibióticos pode afetar a abundância de 30% das bactérias na comunidade intestinal, diminuindo significativamente a riqueza, a diversidade e a uniformidade taxonômicas (DETHLEFSEN *et al.*, 2008; DETHLEFSEN e RELMAN, 2011).

Tabela 13- Gêneros bacterianos e médias da abundância relativa $\geq 1\%$ em amostras de fezes oriundas do grupo de crianças com DF e grupo CTL.

Principais Gêneros Bacterianos	Abundância (%)	Principais Gêneros Bacterianos	Abundância (%)
CTL <i>Faecalibacterium</i>	10,2738	DF <i>Faecalibacterium</i>	8,1898
CTL <i>Bifidobacterium</i>	9,2106	DF <i>Bacteroides</i>	7,2688
CTL <i>Holdemanella</i> (P=0,005) s	4,9759	DF <i>Bifidobacterium</i>	6,3675
CTL <i>Prevotella</i> (P=0,04)	3,9402	DF <i>Subdoligranulum</i>	5,3018
CTL <i>Subdoligranulum</i>	3,641	DF <i>Megamonas</i> (p=0,03)	4,2953
CTL <i>Catenibacterium</i> (P=0,07)	3,5656	DF <i>Streptococcus</i>	3,634

CTL <i>Ruminococcus</i> (P=0,07)	3,0877	DF <i>Prevotella</i>	3,1562
CTL <i>Streptococcus</i>	3,0035	DF <i>Holdemanella</i>	3,0895
CTL <i>Dialister</i> (P=0,03)	2,9841	DF <i>Catenibacterium</i>	2,8943
CTL <i>Ruminococcaceae_ge</i> (P=0,002)	2,654	DF <i>Ruminococcus</i>	2,14
CTL <i>Collinsella</i> (P=0,05)	2,5403	DF <i>Collinsella</i>	1,9422
CTL <i>Bacteroides</i> (P=0,056)	2,3826	DF <i>Escherichia-Shigella</i>	1,6735
CTL <i>Ruminococcaceae_UCG-0014</i> (P=0,05)	1,3259	DF <i>Ruminococcaceae_ge</i>	1,5194
CTL <i>Ruminococcaceae_UCG-002</i> (P=0,001)	1,3023	DF <i>Dialister</i>	1,4341
		DF <i>Parabacteroides</i>	1,1214
Total	54,8875	Total	54,0278

Na tabela 14 encontra-se a relação dos gêneros com divergência de abundância entre os grupos de crianças com DF e CTL, e selecionadas algumas publicações que tratam das interações entre os microorganismos e os seus hospedeiros ou com as variações ambientais. Entre 42 gêneros divergentes, apenas dez foram abundantes nas amostras de fezes oriundas das crianças com DF quando comparado ao grupo CTL: *Bacteroides*, *Blautia*, *Eggerthella*, *Erysipelatoclostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Hungatella*, *Megamonas*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* e *Rothia*.

Tabela 14 – Gêneros da microbiota intestinal com divergência de abundância entre as amostras de fezes obtidas de crianças com DF e grupo CTL e exemplos de publicações acerca de interações com o hospedeiro ou com variações ambientais.

Principais Gêneros Bacterianos	Maior Abundância	Interação com o hospedeiro
<i>Bacteroides</i> (p=0,05)	DF	Bactéria comensal classificada como enterótipo (ARUMUNGA <i>et al.</i> , 2011).
<i>Barnesiella</i> (p=0,002)	CTL	Marcador de microbiota saudável MANCABELLI <i>et al.</i> , 2017). Diminui o VRE (Vancomycin-resistant Enterococcus) o que reduz as infecções por essa bactéria em pacientes que receberam transplante alogênico de células-tronco hematopoética (UBEDA <i>et al.</i> , 2013). Apresentou-se como um dos gêneros mais abundância no TEA (ZHAO <i>et al.</i> , 2019) e em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Blautia</i> (p=0,04)	DF	Diminuem complicações da doença do enxerto contra o hospedeiro-DECH. Gênero com abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Catenibacterium</i> (p=0,07)		Gênero que apresenta menor abundância em

	CTL	pacientes com DII (MASOODI <i>et al.</i> , 2019); e em pacientes com Câncer Colorretal (Al <i>et al.</i> , 2019). Apresenta também abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Christensenellaceae_R-7_group</i> ($p=0,008$)	CTL	Marcador de microbiota saudável MANCABELLI <i>et al.</i> , 2017).
<i>Collinsella</i> ($p=0,05$)	CTL	Reduz a expressão de proteínas das junções firmes (ZO-1), com consequente aumento da permeabilidade intestinal; Aumenta da expressão da IL-17 (mais que o dobro) e do NFkB1 induzindo resposta inflamatório e ativação de Neutrófilo (CHEN <i>et al.</i> , 2016); A abundância de <i>Collinsella</i> correlacionou-se negativamente com a ingestão de fibras na dieta (GOMEZ-ARANGO <i>et al.</i> , 2018); Esse gênero apresentou abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Coprococcus</i> ($p=0,02$)	CTL	O gênero <i>Coprococcus</i> é um dos principais produtores de butirato (RÍOS-COVIÁN <i>et al.</i> , 2016). Marcador de microbiota saudável; Segundo Valles-Colomer <i>et al.</i> (2019), <i>Faecalibacterium</i> e <i>Coprococcus</i> foram relacionadas qualidade de vida e que <i>Coprococcus</i> spp. e <i>Dialister</i> estavam esgotadas na depressão. Apresentou abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Desulfovibrio</i> ($p=0,005$)	CTL	Gênero associado aos níveis de N-Óxido Trimetilamina (TMAO) (FU <i>et al.</i> , 2020). É também um dos gênero com maior abundância em crianças com Transtorno do Espectro Autista. (BEZAWADA <i>et al.</i> , 2020). A abundância aumentada desse gênero foi associada a dieta rica em ácido fólico (GURWARA <i>et al.</i> , 2019).
<i>Dialister</i> ($p=0,03$)	CTL	Segundo Valles-Colomer <i>et al.</i> , (2019) <i>Faecalibacterium</i> e <i>Coprococcus</i> foram relacionadas qualidade de vida e que <i>Coprococcus</i> spp. e <i>Dialister</i> estavam esgotadas na depressão. A abundância aumentada desse gênero foi associada a dieta rica em ácido fólico (GURWARA <i>et al.</i> , 2019).
<i>Eggerthella</i> ($p<0,001$)	DF	As estirpes de <i>Eggerthella</i> são importantes no metabolismo do ácido biliar no intestino (HARRIS <i>et al.</i> , 2018). Está associadas ao metabolismo lipídico e de xenobiótico do hospedeiro (CHO <i>et al.</i> , 2016). Gênero com abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Enterorhabdus</i> ($p=0,03$)	CTL	Um dos gêneros com abundância reduzida devido ao uso de heparina por via oral (ZHOU <i>et al.</i> , 2019)

<i>Erysipelatoclostridium</i> ($p=0,002$)	DF	Gênero com abundância reduzido em paciente com dieta rica em folato (GURWARA <i>et al.</i> , 2019) e em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020). Gênero correlacionado com a nefrolitíase através da concentração de oligoelementos no sangue, incluindo potássio, sódio, cálcio e cloro (TANG <i>et al.</i> , 2018).
<i>Fournierella</i> ($p=0,01$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Fusicatenibacter</i> ($p=0,04$)	CTL	Gênero com abundância aumentada em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020) E também correlacionado com a nefrolitíase através da concentração de oligoelementos no sangue, incluindo potássio, sódio, cálcio e cloro (TANG <i>et al.</i> , 2018).
<i>Holdemanella</i> ($p=0,005$)	CTL	O gênero <i>Holdemanella</i> foi associado positivamente à proporção de gordura andróide no sexo masculino e negativamente associado ao sexo feminino (MIN <i>et al.</i> , 2019).
<i>Klebsiella</i> ($p=0,03$)	DF	Gênero associado hipertensão arterial e a inflamação subclínica gerada pelo LPS (LI <i>et al.</i> , 2017). Apresentou abundância aumentada em modelo animal, sobre uso ampicilina, com as proteínas de junção estreita ZO-1 e ocludinas reduzidas para metade em relação aos controle (SHI <i>et al.</i> , 2018).
<i>Lachnospiraceae</i> _UCG-003 ($p=0,02$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Lachnospiraceae</i> _UCG-010 ($p=0,004$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Lactobacillus</i> ($p=0,03$)	DF	Segundo Macho Fernandez <i>et al.</i> (2011), os <i>Lactobacillus</i> , através da liberação de peptídeos da parede celular, são capazes de inibir a resposta inflamatória via do NFκB. É também um dos gênero com maior abundância em crianças com Transtorno do Espectro Autista (BEZAWADA <i>et al.</i> , 2020).
<i>Libanicoccus</i> ($p=0,02$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Megamonas</i> ($p=0,03$)	DF	Gênero onde maior abundância relacionada a obesidade infantil (CHEN <i>et al.</i> , 2020), com representatividade relacionada a ingestão de gordura (WAN <i>et al.</i> , 2019), ao Transtorno de Espectro Autista-TEA (ZHAO <i>et al.</i> , 2019), e também aos níveis de testosterona em homens (SHIN <i>et al.</i> , 2019). Gênero com abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Mitsuokella</i> ($p=0,006$)	CTL	Gênero associado aos níveis de N-Óxido Trimetilamina (TMAO) (FU <i>et al.</i> , 2020).
<i>Oscillibacter</i> ($p=0,004$)	CTL	Gênero relacionado a depressão, pois <i>Oscillibacter</i> tem o ácido valérico como principal

		produto metabólico final, um homólogo do GABA, principal neurotransmissor inibitório do SNC (NASERIBAFROUEI <i>et al.</i> , 2014).
<i>Oxalobacter</i> ($p=0,001$)	CTL	Gênero formado por bactérias degradadoras de oxalato, que o um constituinte da dieta e do metabolismo humana, que o acúmulo excessiva pode levar a condições patológicas incluindo cálculos renais, derrames nas articulações e artralgias (LIU <i>et al.</i> , 2017).
<i>Peptococcus</i> ($p=0,01$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Prevotella</i> ($p=0,04$)	CTL	Bacteria comensal classificada como enterótipo (ARUMUNGA <i>et al.</i> , 2011). Sua baixa abundância, associada a uma alta proporção de <i>Proteobacterias</i> e <i>Actinobacterias</i> foram identificadas como indicadores da DII (MOBEEN <i>et al.</i> , 2018). Esse gênero juntamente com o <i>Ruminococcaceae</i> UCG-002 foram significativamente mais prevalentes em pacientes com transtorno depressivo maior do que naqueles com transtorno bipolar ou em controles saudáveis (RHEE <i>et al.</i> , 2020). Foi também associado aos níveis de N-Óxido Trimetilamina (TMAO) (FU <i>et al.</i> , 2020).
<i>Rikenellaceae</i> _RC9_gut_group ($p=0,03$)	DF	Esse grupo estava significativamente enriquecido na infarto do miocárdio e pode se associar ao metabolismo lipídico (SUN <i>et al.</i> , 2019; ZHOU <i>et al.</i> , 2018).
<i>Rothia</i> ($p=0,02$)	DF	Gênero com abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020). A diminuição da abundância relativa no início da infância foi associada ao aumento do risco de asma (SIMONYTE SJÖDIN <i>et al.</i> , 2016; ARRIETA <i>et al.</i> , 2015).
<i>Ruminiclostridium</i> _5 ($p=0,04$)	CTL	Gênero correlacionado com a nefrolitíase através da concentração de oligoelementos no sangue, incluindo potássio, sódio, cálcio e cloro (TANG <i>et al.</i> , 2018).
<i>Ruminococcaceae</i> _ge ($p=0,002$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Ruminococcaceae</i> _NK4A2_14_group ($p=0,0001$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-0010 ($p=0,001$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-0014 ($p=0,05$)	CTL	Os níveis séricos de TMAO foram associados positivamente ao aumento da abundância de <i>Aerococcaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> _UCG.005, <i>Ruminococcaceae</i> _UCC.014 (GAO <i>et al.</i> , 2020; FU <i>et al.</i> , 2020). No entanto segundo Sun <i>et al.</i> , 2019 esse grupo, juntamente com outros táxons estavam diminuídos na infarto do miocárdio. Gênero com abundância aumentada em

		indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020)
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-002 ($p=0,001$)	CTL	O gêneros <i>Ruminococcaceae</i> UCG-002 juntamente com o <i>Prevotella</i> 2 foram significativamente mais prevalentes em pacientes com transtorno depressivo maior do que naqueles com transtorno bipolar ou em controles saudáveis (RHEE <i>et al.</i> , 2020).
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-003 ($p=0,01$)	CTL	Gênero com abundância aumentada em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-005 ($p=0,002$)	CTL	Marcador de microbiota saudável MANCABELLI <i>et al.</i> , 2017). Segundo Sun <i>et al.</i> , 2019 esse grupo estava diminuídos na infarto do miocárdio. No entanto em outro trabalho, o N-óxido de trimetilamina (TMAO) no plasma teve seus níveis séricos associados positivamente ao aumento da abundância de <i>Aerococcaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> _UCG.005, <i>Ruminococcaceae</i> _UCC.014 (GAO <i>et al.</i> , 2020; FU <i>et al.</i> , 2020). Gênero com abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Ruminococcus</i> ($p=0,07$)	CTL	Bacteria comensal classificada como enterótipo (ARUMUNGA <i>et al.</i> , 2011). Gênero com abundância aumentada em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Senegalimassilia</i> ($p=0,02$)	CTL	Relação não encontrada.
<i>Slackia</i> ($p=0,01$)	CTL	Está associadas ao metabolismo lipídico e de xenobiótico do hospedeiro (CHO <i>et al.</i> , 2016).
<i>Solobacterium</i> ($p=0,001$) s	CTL	Gênero com abundância reduzida em indivíduos submetidos a antibioticoterapia contra tuberculose multirresistente (WANG <i>et al.</i> , 2020).
<i>Hungatella</i> ($p<0,0005$)	DF	Gêneros produtor de N-ÓxidoTrimetilamina (GENONI <i>et al.</i> , 2019)

Desta forma, a configuração disbiótica da microbiota intestinal, apresentada no grupo de crianças com DF em uso de antibioticoprofilaxia crônica em comparação aos controles, pode alicerçar um série de estudos envolvendo microbiota intestinal e a DF. Pois, diversos estudos com indivíduos sem DF já demonstraram que o uso dos antibióticos está relacionado ao aumento da sensibilidade visceral na fase adulta devido a disbioses intestinais (PUSCEDDU e GAREAU, 2018; O'MAHONY *et al.*, 2014). Essas alterações de microbiota são responsáveis pelo aumento de mediadores pro-inflamatórios e hiperserotonemia que alteram o limiar de excitação de células nociceptivas, causando hiperalgesia, vasoconstrição, ativação plaquetária e aumento de fatores de adesão celular (PUSCEDDU e GAREAU, 2018; O'MAHONY *et al.*, 2014; WIDGEROW e KALARIA, 2012). O

que pode contribuir com a patogênese da DF, visto que as características patognomônicas da doença falciforme são vasocclusão, hemólise, vasoconstrição e crises dolorosas (DIAS *et al.*, 2013; BRASIL, 2009; LOBO *et al.*, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A consolidação do papel dos antibióticos nas disbioses intestinais serviu de pano de fundo para a realização dessa pesquisa, mesmo ciente da impossibilidade de obter um grupo controle formado por crianças menores de cinco anos que vivem com a doença falciforme e sem a utilização adequada de protocolos de antibióticoprofilaxia crônica. Apenas dessa maneira poderia ser avaliado, em estudo de caso-controle clássico, o verdadeiro papel do uso dos antibióticos e a sua influência na microbiota das crianças com DF, sem o viés de estudar um grupo controle sem a doença. Deste modo, o esforço na caracterização da microbiota intestinal dessas crianças, não foi concentrado nas causas, mas na busca pela distância entre o grupo com DF e o controle saudável, que se existente, quais estratégias futuras poderiam ser adotadas para diminuir esse distanciamento, considerando a impossibilidade da retirada do antibiótico da terapia desses pacientes, mas conjunta e temporariamente, realizar tratamentos alternativos como a utilização de vacinas para minimizar as infecções respiratórias e do trato urinário, responsáveis por grande número de óbitos, ou mesmo, como a proposta deste estudo, de compreender os táxons e a abundância desses microorganismos no intestino e pensar em recomposição da microbiota como terapia.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram a existência de uma divergência negativa na composição da microbiota intestinal de um grupo de crianças com a doença falciforme em uso da antibioticoprofilaxia crônica quando comparada ao grupo controle. Pois, a menor diversidade de microorganismos encontrada nas amostras de fezes, associada a uma menor abundância de inúmeros táxons considerados biomarcadores de microbiota intestinal saudável, bem como, aumento na abundância relativa de táxons, como os pertencentes a *Enterobacteriaceae*, que são característicos de situações de disbiose intestinal, indicando um padrão microbiano aberrante, e portanto um ponto comprometedor da sua saúde.

Estudos de caráter longitudinais com foco na avaliação da composição da microbiota intestinal em DF são necessários, considerando que o trato gastrointestinal contém a maior parcela das células imunes ativas, que sinergisticamente com a microbiota intestinal, desempenham funções importantes no combate aos patógenos e na inflamação sistêmica. Pesquisas que avaliem o uso de probióticos e prebióticos, principalmente nos menores de

dois anos de idade, por se tratar de idade crítica no estabelecimento da microbiota intestinal “madura”, com o intuito de restabelecer ou amenizar os impactos sofridos.

Em paralelo, deve-se considerar também, a importância do AME e do parto vaginal para a formação de uma microbiota intestinal saudável nessas crianças, e em especial as com DF. Pois, os baixos índices de amamentação exclusiva e os índices elevados de partos cesarianos encontrados nessa pesquisa, demonstram a necessidade da intensificação de uma política de conscientização de profissionais de saúde, entidades de assistência e familiares, para a importância da microbiota intestinal na qualidade de vida desses pacientes.

Divergências taxonômicas, com o aumento de filos especializados no melhor aproveitamento energético, seja mais vantajoso por estar relacionado com mecanismos compensatórios de obtenção de energia, considerando que os pacientes com DF possuem demanda energética aumentada em virtude da patogênese da doença. A divergência na abundância relativa de membros da família *Ruminococcaceae*, bem como de *Lachnospiraceae*, ambas produtoras de butirato, são importantes para minimizar a inflamação subclínica crônica que potencializam as crises na doença falciforme.

Especula-se que os gêneros *Lactobacillus*, *Blautia* e *Bacteroides*, mais abundantes nas amostras de fezes das crianças com DF, possam mitigar a resposta inflamatória intestinal, devido aos constituintes presentes na parede celular, descritos em diversos trabalhos. Desta forma, a composição da microbiota intestinal pode ser utilizada como foco terapêutico na doença falciforme, e utilizada como parâmetro de avaliação clínica, que precedem procedimentos como o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, visto que táxons como *Blautia* pode diminuir a morbimortalidade na DECH.

Especula-se também, que a maior abundância de *Bacteroides* encontrada nas amostras fecais das crianças do grupo com DF possa aumentar a lectina C, produzida pelas células de Paneth, com impacto na relação entre as bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, com aumento das Gram-negativo. Assim, a maior abundância relativa dos táxons Gram-negativo identificados nas amostras de fezes no grupo de crianças com DF e consequente maior disponibilidade de LPS no lúmen intestinal, possa justificar os percentuais mais elevados de distúrbios gastrointestinais encontrados nessas crianças, além de servir como possível gatilho da crise vaso-oclusiva pela síntese de mediadores pro-inflamatórios. Fato que justificaria a necessidade futura de se avaliar a permeabilidade intestinal de pacientes com doenças falciformes em uso de antibioticoprofilaxia crônica, bem como identificar os aspectos quantitativos e qualitativos relacionados aos mediadores pro-inflamatórios gerados por alterações da microbiota intestinal nesses pacientes. Principalmente os relacionados aos níveis de neutrófilos senescentes por ser considerado o núcleo das crises vaso-oclusivas.

E por fim, estudos para avaliação da diversidade do viroma e microbioma são fundamentais na análise holística da composição e funcionalidade da microbiota do TGI, além da inclusão de um conjunto amplo de variáveis que envolvem a homeostase sanguínea, as condições sociodemográficas, clínico-epidemiológicas e a análise metagenômica direcionada às funções e vias metabólicas que envolvem a microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, T.R.; JAKOBSSON, H.E.; ANDERSSON, A.F.; BJÖRKSTÉN, B.; ENGSTRAND, L.; JENMALM, M.C. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Feb; 129 (2):434-40, 440.e1-2. doi: 10.1016/j.jaci.2011.10.025. Epub 2011 Dec 6. PMID: 22153774.
- AI, D.; PAN, H.; LI, X.; GAO, Y.; LIU, G.; XIA, L.C. Identifying Gut Microbiota Associated With Colorectal Cancer Using a Zero-Inflated Lognormal Model. *Front Microbiol.* 2019 Apr 24;10:826. doi: 10.3389/fmicb.2019.00826. PMID: 31068913; PMCID: PMC6491826.
- ALBERT, M.J.; MATHAN, V.I.; BAKER, S.J. Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature.* 1980 Feb 21; 283 (5749): 781-2. doi: 10.1038/283781a0. PMID: 7354869.
- ALM, J.S.; SWARTZ, J.; BJÖRKSTÉN, B.; ENGSTRAND, L.; ENGSTRÖM, J.; KÜHN, I.; LILJA, G.; MÖLLBY, R.; NORIN, E.; PERSHAGEN, G.; REINDERS, C.; WREIBER, K.; SCHEYNIUS, A. An anthroposophic lifestyle and intestinal microflora in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002 Dec; 13(6): 402-11. doi: 10.1034/j.1399-3038.2002.01062.x. PMID: 12485315.
- ALM, J.S.; SWARTZ, J.; LILJA, G.; SCHEYNIUS, A.; PERSHAGEN, G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet.* 1999 May 1; 353 (9163):1485-8. doi: 10.1016/S0140-6736(98)09344-1. PMID: 10232315.
- ALMEIDA, L.B.; MARINHO, C.B.; SOUZA, C.S.; CHEIB, V.B.P. Disbiose intestinal. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica.* 2009; 24(1):58-65.
- AMORIM, T.; PIMENTEL, H. M.; FONTES, M. I. M. M.; *et al.* Avaliação do programa de triagem neonatal da Bahia entre 2007 e 2009 - As lições da Doença Falciforme. *Gazeta Médica da Bahia.* 2010; 80:10-13.
- ANDRADE, A. Microflora intestinal: uma barreira imunológica desconhecida. Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar na Universidade do Porto, Portugal, 2009/2010.
- ARRIETA, M.C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J.B. Alterations in intestinal permeability. *Gut.* 2006 Oct;55(10):1512-20. doi: 10.1136/gut.2005.085373. PMID: 16966705; PMCID: PMC1856434.
- ARRIETA, M.C.; STIEMSMA, L.T.; DIMITRIU, P.A.; THORSON, L.; RUSSELL, S.; YURIST-DOUTSCH, S.; KUZELJEVIC, B.; GOLD, M.J.; BRITTON, H.M.; LEFEBVRE, D.L.; SUBBARAO, P.; MANDHANE, P.; BECKER, A.; MCNAGNY, K.M.; SEARS, M.R.;

- KOLLMANN, T. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med.* 2015 Sep 30;7(307):307ra152. doi: 10.1126/scitranslmed.aab2271. PMID: 26424567.
- ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; YAMADA, T.; MENDE, D.R.; FERNANDES, G.R.; TAP, J.; BRULS, T.; BATTO, J.M.; 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, H.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.; DORÉ, J.; ANTOLÍN, M.; ARTIGUENAVE, F.; BLOTTIERE, H.M.; ALMEIDA, M.; BRECHOT, C.; CARA, C.; CHERVAUX, C.; CULTRONE, A.; DELORME, C.; DENARIAZ, G.; DERVYN, R.; FOERSTNER, K.U.; FRISS, C.; VAN DE GUCHTE, M.; GUEDON, E.; HAIMET, F.; HUBER, W.; VAN HYLCKAMA-VLIEG, J.; JAMET, A.; JUSTE, C.; KACI, G.; KNOL, J.; LAKHDARI, O.; LAYEC, S.; LE ROUX, K.; MAGUIN, E.; MÉRIEUX, A.; MELO MINARDI, R.; M'RINI, C.; MULLER, J.; OOZEER, R.; PARKHILL, J.; RENAULT, P.; RESCIGNO, M.; SANCHEZ, N.; SUNAGAWA, S.; TORREJON, A.; TURNER, K.; VANDEMEULEBROUCK, G.; VARELA, E.; WINOGRADSKY, Y.; ZELLER, G.; WEISSENBACH, J.; EHRlich, S.D.; BORK, P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011 May 12; 473(7346):174-80. doi: 10.1038/nature09944. Epub 2011 Apr 20. Erratum in: *Nature.* 2011 Jun 30;474(7353):666. Erratum in: *Nature.* 2014 Feb 27;506(7489):516. PMID: 21508958; PMCID: PMC3728647.
- ATHANASSIOU-METAXA, M.; TSATRA I.; KOUSSI, A. Lithiase biliaire chez les patients drépanocytaires. L'expérience grecque [Biliary lithiasis in patients with sickle cell anemia. Greek experience]. *Arch Pediatr.* 2002 Aug; 9(8):878. French. doi: 10.1016/s0929-693x(02)00014-3. PMID: 12205804.
- BÄCKHED, F.; ROSWALL, J.; PENG, Y.; FENG, Q.; JIA, H.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; LI, Y.; XIA, Y.; XIE, H.; ZHONG, H.; KHAN, M.T.; ZHANG, J.; LI, J.; XIAO, L.; AL-AAMA, J.; ZHANG, D.; LEE, Y.S.; KOTOWSKA, D.; COLDING, C.; TREMAROLI, V.; YIN, Y.; BERGMAN, S.; XU, X.; MADSEN, L.; KRISTIANSEN, K.; DAHLGREN, J.; WANG, J. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe.* 2015 Jun 10;17(6):852. doi: 10.1016/j.chom.2015.05.012. Epub 2015 Jun 10. Erratum for: *Cell Host Microbe.* 2015 May 13;17(5):690-703. PMID: 26308884.
- BAGGIO, L.L.; DRUCKER, D.J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007 May; 132(6): 2131-57. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.054. PMID: 17498508.
- BALVOČIŪTĒ, M.; HUSON D.H. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare? *BMC Genomics.* 2017 Mar 14;18(Suppl 2):114. doi: 10.1186/s12864-017-3501-4. PMID: 28361695; PMCID: PMC5374703.
- BARBOSA, F. H. F.; MARTINS, F. DOS S.; BARBOSA, L. P. J. DE L.; NICOLI, J. R. Microbiota indígena do trato gastrintestinal. *Revista de biologia e ciência da terra.* 2010. jan./jun; 10 (1): 78-93.
- BARBOZA JUNIOR, M.S.; SILVA, T.M.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.A. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Dec; 32(12):1499-504. doi: 10.1590/s0100-879x1999001200008. PMID: 10585631.

- BARDEN, E.M.; KAWCHAK, D.A.; OHENE-FREMPONG, K.; STALLINGS, V.A.; ZEMEL, B.S. Body composition in children with sickle cell disease. *Am J Clin Nutr.* 2002 Jul; 76 (1):218-25. doi: 10.1093/ajcn/76.1.218. PMID: 12081838.
- BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E.G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med.* 2016 Jun; 22(6):458-478. doi: 10.1016/j.molmed.2016.04.003. Epub 2016 May 10. PMID: 27178527; PMCID: PMC4885777.
- BELZER, C.; DE VOS, W.M. Microbes inside--from diversity to function: the case of Akkermansia. *ISME J.* 2012 Aug; 6(8):1449-58. doi: 10.1038/ismej.2012.6. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22437156; PMCID: PMC3401025.
- BENEVIDES, C. M. DE J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. *Segurança Alimentar E Nutricional.* 2011 18(2), 67-79. doi: 10.20396/san.v18i2.8634679
- BERDANI, R.; ROSSI, E. Intestinal microbiota and probiotics: implications for colon cancer. *Jornal Português de Gastrenterologia.* 2009 jan./fev; 15:19-28.
- BEZAWADA, N.; PHANG, T.H.; HOLD, G.L.; HANSEN, R. Autism Spectrum Disorder and the Gut Microbiota in Children: A Systematic Review. *Ann Nutr Metab.* 2020 Jan 24:1-14. doi: 10.1159/000505363. Epub ahead of print. PMID: 31982866.
- BISGAARD, H.; LI, N.; BONNELYKKE, K.; CHAWES, B.L.; SKOV, T.; PALUDAN-MÜLLER, G.; STOKHOLM, J.; SMITH, B.; KROGFELT, K.A. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Sep;128(3):646-52.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2011.04.060. Epub 2011 Jul 22. PMID: 21782228.
- BOBROWSKI, R.; BIONDI, D. Comportamento de Índices de Diversidade na Composição da Arborização de Ruas. *Floresta e Ambiente* 2016; 23(4): 475-486. doi: 10.1590/2179-8087.147915
- BOKULICH, N.A.; CHUNG, J.; BATTAGLIA, T.; HENDERSON, N.; JAY, M.; LI, H.; D LIEBER, A.; WU F.; PEREZ-PEREZ, G.I.; CHEN, Y.; SCHWEIZER, W.; ZHENG, X.; CONTRERAS, M.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; BLASER, M.J. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med.* 2016 Jun 15; 8(343): 343ra82. doi: 10.1126/scitranslmed.aad7121. PMID: 27306664; PMCID: PMC5308924.
- BRADDOCK, M.; QUINN, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Apr; 3(4):330-9. doi: 10.1038/nrd1342. PMID: 15060528.
- BRANDT, K; SAMPAIO, M; MIUKI, C. Importance of the intestinal microflora. *Pediatria, São Paulo.* 2006 ago./set; 28 (2):117-127.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2012). Doença falciforme: condutas básicas para tratamento. Brasília, DF. Acesso em 20/03/2018 bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_condutas_basicas.pdf
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (2018). Portaria conjunta nº 05: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. Acesso em 04/09/2019.

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/22/Portaria-Conjunta-PCDT-Doenca-Falciforme.fev.2018.pdf>

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA. (2009). Manual de eventos agudos em doença falciforme. Brasília, DF. Recuperado de http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_eventos_agudos_doenca_falciforme.pdf

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS, Sistema Nacional de Nascidos Vivos - SINASC. Acesso em 28/01/2020. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/pnvbr.def>

BRUNETTA, D. M.; CLÉ, D. V.; HAES, T. M.; Roriz-Filho, J. S.; Morigut, J. C. Manejo das complicações agudas da doença falciforme. *Medicina (USP.FMRP)*. 2010; 43 (3):231-237.

BRZOZOWSKI, B.; MAZUR-BIALY, A.; PAJDO, R.; KWIECIEN, S.; BILSKI, J.; ZWOLINSKA-WCISLO, M.; MACH, T.; BRZOZOWSKI, T. Mechanisms by which Stress Affects the Experimental and Clinical Inflammatory Bowel Disease (IBD): Role of Brain-Gut Axis. *Curr Neuropharmacol*. 2016; 14(8):892-900. doi: 10.2174/1570159x14666160404124127. PMID: 27040468; PMCID: PMC5333596.

BZIKOWSKA, A.; CZERWONOGRODZKA-SENCZYNA, A.; WESOŁOWSKA, A.; WEKER, H. Nutrition during breastfeeding - impact on human milk composition. *Pol Merkur Lekarski*. 2017 Dec 22;43(258):276-280. PMID: 29298968.

CAMPOS, Ingrid de Araújo. Avaliação da atividade imunomoduladora mediada por *Zymomonas mobilis* UFPEDA 202 (CP4). Recife, 2012. 84f.: Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia Industrial, 2012.

CANANI, R.B.; COSTANZO, M.D.; LEONE, L.; PEDATA, M.; MELI, R.; CALIGNANO, A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2011 Mar 28;17(12):1519-28. doi: 10.3748/wjg.v17.i12.1519. PMID: 21472114; PMCID: PMC3070119.

CANÇADO, R. D.; LOBO, C.; ÂNGULO, I .L.; ARAÚJO, P. I. C.; JESUS, J. A. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. [online]. 2009; 31(5): 361-366. Epub Oct 09, 2009. ISSN 1516-8484. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000076>.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010 May; 7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303. Epub 2010 Apr 11. PMID: 20383131; PMCID: PMC3156573.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4516-22. doi: 10.1073/pnas.1000080107. Epub 2010 Jun 3. PMID: 20534432; PMCID: PMC3063599.

- CARABOTTI, M.; SCIROCCO, A.; MASELLI, M.A.; SEVERI, C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol.* 2015 Apr-Jun;28(2):203-209. PMID: 25830558; PMCID: PMC4367209.
- CARLET J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2012 Nov 27;1(1):39. doi: 10.1186/2047-2994-1-39. PMID: 23181506; PMCID: PMC3554492.
- CARRENHO, M.C.M. Frutooligossacarídeos (FOS) e inulina: suplementação necessária para o tratamento de disbiose intestinal. In: 14° Congresso Nacional de Iniciação Científica, São Paulo, 2014.
- CASH, H.L.; WHITHAM, C.V.; BEHRENDT, C.L.; HOOPER, L.V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science.* 2006 Aug 25; 313(5790):1126-30. doi: 10.1126/science.1127119. PMID: 16931762; PMCID: PMC2716667.
- CHEN, J.; WRIGHT, K.; DAVIS, J.M.; JERALDO, P.; MARIETTA, E.V.; MURRAY, J.; NELSON, H.; MATTESON, E.L.; TANEJA, V. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* 2016 Apr 21; 8(1):43. doi: 10.1186/s13073-016-0299-7. PMID: 27102666; PMCID: PMC4840970.
- CHEN, X.; SUN, H.; JIANG, F.; SHEN, Y.; LI, X.; HU, X.; SHEN, X.; WEI, P. Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing. *PeerJ.* 2020 Jan 14; 8:e8317. doi: 10.7717/peerj.8317. PMID: 31976177; PMCID: PMC6968493.
- CHO, G.S.; RITZMANN, F.; ECKSTEIN, M.; HUCH, M.; BRIVIBA, K.; BEHSNILIAN, D.; NEVE, H.; FRANZ, C.M. Quantification of *Slackia* and *Eggerthella* spp. in Human Feces and Adhesion of Representatives Strains to Caco-2 Cells. *Front Microbiol.* 2016 May 9; 7:658. doi: 10.3389/fmicb.2016.00658. PMID: 27242689; PMCID: PMC4860493.
- CHO, I.; YAMANISHI, S.; COX, L.; METHÉ, B.A.; ZAVADIL, J.; LI, K.; GAO, Z.; MAHANA, D.; RAJU, K.; TEITLER, I.; LI, H.; ALEKSEYENKO, A.V.; BLASER, M.J. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature.* 2012 Aug 30;488(7413):621-6. doi: 10.1038/nature11400. PMID: 22914093; PMCID: PMC3553221.
- CLEMENTE, J.C.; URSELL, L.K.; PARFREY, L.W.; KNIGHT, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 2012 Mar 16; 148(6):1258-70. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.035. PMID: 22424233; PMCID: PMC5050011.
- COLLADO, M.C.; DERRIEN, M.; ISOLAURI, E.; DE VOS, W.M.; SALMINEN, S. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Dec; 73(23):7767-70. doi: 10.1128/AEM.01477-07. Epub 2007 Oct 12. PMID: 17933936; PMCID: PMC2168041.
- COLLINS, S.L.; PATTERSON, A.D. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Jan;10(1):19-32. doi: 10.1016/j.apsb.2019.12.001. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31998605; PMCID: PMC6984741.
- CONLY, J.M.; STEIN, K.; WOROBETZ, L.; RUTLEDGE-HARDING, S. The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *Am J Gastroenterol.* 1994 Jun; 89(6):915-23. PMID: 8198105.

- COX, A.J.; WEST, N.P.; CRIPPS, A.W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015 Mar; 3(3):207-15. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70134-2. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25066177.
- COX, A.J.; ZHANG, P.; BOWDEN, D.W.; DEVEREAUX, B.; DAVOREN, P.M.; CRIPPS, A.W.; WEST, N.P. Increased intestinal permeability as a risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2017 Apr;43(2):163-166. doi: 10.1016/j.diabet.2016.09.004. Epub 2016 Oct 10. PMID: 27745826.
- CROST, E.H.; TAILFORD, L.E.; LE GALL, G.; FONS, M.; HENRISSAT, B.; JUGE, N. Utilisation of mucin glycans by the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus* is strain-dependent. *PLoS One.* 2013 Oct 25; 8(10):e76341. doi: 10.1371/journal.pone.0076341. PMID: 24204617; PMCID: PMC3808388.
- CRUZ-MACHADO, S. DA S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da Transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. *Revista de Biologia.* 2010 jun; 4:40-43. ISSN 1984-5154, DOI 10.7594/revbio
- DAVIS, B.K.; WEN, H.; TING, J.P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:707-35. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101405. PMID: 21219188; PMCID: PMC4067317.
- DE ARAUJO, O.M.; IVO, M.L., FERREIRA JÚNIOR, M.A.; PONTES, E.R.; BISPO, I.M.; DE OLIVEIRA, E.C. Survival and mortality among users and non-users of hydroxyurea with sickle cell disease. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2015 Jan-Feb;23(1):67-73. doi: 10.1590/0104-1169.3385.2526. PMID: 25806633; PMCID: PMC4376033.
- DE FILIPPIS, F.; PELLEGRINI, N.; VANNINI, L.; JEFFERY, I.B.; LA STORIA, A.; LAGHI, L.; SERRAZANETTI, D.I.; DI CAGNO, R.; FERROCINO, I.; LAZZI, C.; TURRONI, S.; COCOLIN, L.; BRIGIDI, P.; NEVIANI, E.; GOBBETTI, M.; O'TOOLE, P.W.; ERCOLINI, D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut.* 2016 Nov; 65(11):1812-1821. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309957. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26416813.
- DE THEIJE, C.G.; WU, J.; DA SILVA, S.L.; KAMPHUIS, P.J.; GARSSSEN, J.; KORTE, S.M.; KRANEVELD, A.D. Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol.* 2011 Sep; 668 Suppl 1:S70-80. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.07.013. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21810417.
- DENIPOTE, F.G.; TRINDADE, E.B.; BURINI, R.C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon [Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer]. *Arq Gastroenterol.* 2010 Jan-Mar; 47(1):93-8. doi: 10.1590/s0004-28032010000100016. PMID: 20520982.
- DERRIEN, M.; BELZER, C.; DE VOS, W.M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog.* 2017 May; 106:171-181. doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26875998.
- DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M.L.; RELMAN, D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008 Nov 18;6(11):e280. doi: 10.1371/journal.pbio.0060280. PMID: 19018661; PMCID: PMC2586385.
- DETHLEFSEN, L.; RELMAN, D.A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4554-61. doi: 10.1073/pnas.1000087107. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20847294; PMCID: PMC3063582.
- DIAS, T.; OLIVEIRA, C.; ENUMO, S.; PAULA, K. A dor no cotidiano de cuidadores e crianças com anemia falciforme. *Psicologia USP*. 2013 Sept/Dec; 24(3):391-411. <https://doi.org/10.1590/S0103-65642013000300003>
- DINARELLO, C.A. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr*. 2006 Feb; 83(2):447S-455S. doi: 10.1093/ajcn/83.2.447S. PMID: 16470011.
- DINLEYICI, E.C.; DALGIC, N.; GUVEN, S.; METIN, O.; YASA, O.; KURUGOL, Z.; TUREL, O.; TANIR, G.; YAZAR, A.S.; ARICA, V.; SANCAR, M.; KARBUZ, A.; EREN, M.; OZEN, M.; KARA, A.; VANDENPLAS, Y. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 shortens acute infectious diarrhea in a pediatric outpatient setting. *J Pediatr (Rio J)*. 2015 Jul-Aug; 91(4):392-6. doi: 10.1016/j.jped.2014.10.009. Epub 2015 May 16. PMID: 25986615.
- DONOWITZ J.R.; PETRI WA, JR. Pediatric small intestine bacterial overgrowth in low-income countries. *Trends Mol Med*. 2015 Jan; 21(1):6-15. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.001. Epub 2014 Nov 15. PMID: 25486880; PMCID: PMC4402728.
- DORSHOW, R.B.; HALL-MOORE, C.; SHAIKH, N.; TALCOTT, M.R.; FAUBION, W.A.; ROGERS, T.E.; SHIEH, J.J.; DEBRECZENY, M.P.; JOHNSON, J.R.; DYER, R.B.; SINGH, R.J.; TARR, P.I. Measurement of gut permeability using fluorescent tracer agent technology. *Sci Rep*. 2017 Sep 7; 7(1):10888. doi: 10.1038/s41598-017-09971-y. PMID: 28883476; PMCID: PMC5589723.
- DOUGLAS, C. R.; CISTERNAS, J. R. *Fisiologia clínica do sistema digestório*. Sao Paulo: Tecmed, 2004.
- DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARLIOZ, A.; MARTELIN, R.; GAYRAL, J.P.; RAOULT, D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol*. 2000 Oct; 38(10):3623-30. PMID: 11015374; PMCID: PMC87447.
- DRUCKER, D.J. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*. 2006 Mar; 3(3):153-65. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.004. PMID: 16517403.
- DUTRA, F.F.; ALVES, L.S.; RODRIGUES, D.; FERNANDEZ, P.L.; DE OLIVEIRA, R.B.; GOLENBOCK, D.T.; ZAMBONI, D.S.; BOZZA, M.T. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 30; 111(39):E4110-8. doi: 10.1073/pnas.1405023111. Epub 2014 Sep 15. PMID: 25225402; PMCID: PMC4191786.
- ECKBURG, P.B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; RELMAN, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1635-8. doi: 10.1126/science.1110591. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831718; PMCID: PMC1395357.
- EN BESTEN, G.; BLEEKER, A.; GERDING, A.; VAN EUNEN, K.; HAVINGA, R.; VAN DIJK, T.H.; OOSTERVEER, M.H.; JONKER, J.W.; GROEN, A.K.; REIJNGOUD, D.J.; BAKKER, B.M. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes*. 2015 Jul; 64(7):2398-408. doi: 10.2337/db14-1213. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25695945.

- FERNANDES, A. P. P. C.; JANUÁRIO, J. N.; CANGUSSU, C. B.; DE MACEDO, D. L.; VIANA, M. B. Mortalidade de crianças com doença falciforme: um estudo de base populacional. *Jornal de Jornal de Pediatria*. 2010 July/Aug; 86(4): 279-284. ISSN 0021-7557. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572010000400006>.
- FLINT, H.J.; SCOTT, K.P.; LOUIS, P.; DUNCAN, S.H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Sep 4; 9(10):577-89. doi: 10.1038/nrgastro.2012.156. PMID: 22945443.
- FORNO, E.; ONDERDONK, A.B.; MCCRACKEN, J.; LITONJUA, A.A.; LASKEY, D.; DELANEY, M.L.; DUBOIS, A.M.; GOLD, D.R.; RYAN, L.M.; WEISS, S.T.; CELEDÓN, J.C. Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. *Clin Mol Allergy*. 2008 Sep 22;6:11. doi: 10.1186/1476-7961-6-11. PMID: 18808715; PMCID: PMC2562383.
- FRÖHLICH, E.E.; FARZI, A.; MAYERHOFER, R.; REICHMANN, F.; JAČAN, A.; WAGNER, B.; ZINSER, E.; BORDAG, N.; MAGNES, C.; FRÖHLICH, E.; KASHOFER, K.; GORKIEWICZ, G.; HOLZER, P. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav Immun*. 2016 Aug;56:140-55. doi: 10.1016/j.bbi.2016.02.020. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26923630; PMCID: PMC5014122.
- FROTA, K.M.G.; SOARES, N.R.M.; MUNIZ, V.R.C.; Fontenelle, L. C.; de Carvalho, C. M. R. G. Efeito de prebióticos e probióticos na microbiota intestinal e nas alterações metabólicas de indivíduos obesos. *Nutrire*. 2015 Aug; 40(2):173-187. <http://dx.doi.org/10.4322/2316-7874.55314>
- FU, B.C.; HULLAR, M.A.J.; RANDOLPH, T.W.; FRANKE, A.A.; MONROE, K.R.; CHENG, I.; WILKENS, L.R.; SHEPHERD, J.Á.; MADELEINE, M.M.; LE MARCHAND, L.; LIM, U.; LAMPE, J.W. Associations of plasma trimethylamine N-oxide, choline, carnitine, and betaine with inflammatory and cardiometabolic risk biomarkers and the fecal microbiome in the Multiethnic Cohort Adiposity Phenotype Study. *Am J Clin Nutr*. 2020 Feb 13:nqaa015. doi: 10.1093/ajcn/nqaa015. Epub ahead of print. PMID: 32055828.
- GAO, J.; YAN, K.T.; WANG, J.X.; DOU, J.; WANG, J.; REN, M.; MA, J.; ZHANG, X.; LIU, Y. Gut microbial taxa as potential predictive biomarkers for acute coronary syndrome and post-STEMI cardiovascular events. *Sci Rep*. 2020 Feb 14;10(1):2639. doi: 10.1038/s41598-020-59235-5. PMID: 32060329; PMCID: PMC7021689.
- GENONI, A.; CHRISTOPHERSEN, C.T.; LO, J.; COGHLAN, M.; BOYCE, M.C.; BIRD, A.R.; LYONS-WALL, P.; DEVINE, A. Long-term Paleolithic diet is associated with lower resistant starch intake, different gut microbiota composition and increased serum TMAO concentrations. *Eur J Nutr*. 2019 Jul 5. doi: 10.1007/s00394-019-02036-y. Epub ahead of print. PMID: 31273523.
- GOHL, D.M.; VANGAY, P.; GARBE, J.; MACLEAN, A.; HAUGE, A.; BECKER, A.; GOULD, T.J.; CLAYTON, J.B.; JOHNSON, T.J.; HUNTER, R.; KNIGHTS, D.; BECKMAN, K.B. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. *Nat Biotechnol*. 2016 Sep; 34(9):942-9. doi: 10.1038/nbt.3601. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27454739.
- GOMEZ-ARANGO, L.F.; BARRETT, H.L.; WILKINSON, A.S.; CALLAWAY, L.K.; MCINTYRE, H.D.; MORRISON, M.; DEKKER NITERT, M. Low dietary fiber intake increases *Collinsella* abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes*. 2018; 9(3):189-201. doi: 10.1080/19490976.2017.1406584. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29144833; PMCID: PMC6219589.

- GONÇALVES, M.A. P. Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa Porto, 2014.
- GOODRICH, J.K.; WATERS, J.L.; POOLE, A.C.; SUTTER, J.L.; KOREN, O.; BLEKHMANN, R.; BEAUMONT, M.; VAN TREUREN, W.; KNIGHT, R.; BELL, J.T.; SPECTOR, T.D.; CLARK, A.G.; LEY, R.E. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):789-99. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.053. PMID: 25417156; PMCID: PMC4255478.
- GORVITOVSKAIA, A.; HOLMES, S.P.; HUSE, S.M. Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*. 2016 Apr 12; 4:15. doi: 10.1186/s40168-016-0160-7. PMID: 27068581; PMCID: PMC4828855.
- GRÖNLUND, M.M.; LEHTONEN, O.P.; EEROLA, E.; KERO, P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999 Jan;28(1):19-25. doi: 10.1097/00005176-199901000-00007. PMID: 9890463.
- GUAMER F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad [Role of intestinal flora in health and disease]. *Nutr Hosp*. 2007 May; 22 (2):14-9. PMID: 17679289.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8; 361(9356):512-9. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0. PMID: 12583961.
- GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001 Feb; 13(2):85-94. doi: 10.1016/s0898-6568(00)00149-2. PMID: 11257452.
- GURWARA, S.; AJAMI, N.J.; JANG, A.; HESSEL, F.C.; CHEN, L.; PLEW, S.; WANG, Z.; GRAHAM, D.Y.; HAIR, C.; WHITE, D.L.; KRAMER, J.; KOURKOUMPETIS, T.; HOFFMAN, K.; COLE, R.; HOU, J.; HUSAIN, N.; JARBRINK-SEHGAL, M.; HERNAEZ, R.; KANWAL, F.; KETWAROO, G.; SHAH, R.; VELEZ, M.; NATARAJAN, Y.; EL-SERAG, H.B.; PETROSINO, J.F.; JIAO, L. Dietary Nutrients Involved in One-Carbon Metabolism and Colonic Mucosa-Associated Gut Microbiome in Individuals with an Endoscopically Normal Colon. *Nutrients*. 2019 Mar 13; 11(3):613. doi: 10.3390/nu11030613. PMID: 30871224; PMCID: PMC6470629.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2011. 1264 p.
- HALL, A.B.; YASSOUR, M.; SAUK, J.; GARNER, A.; JIANG, X.; ARTHUR, T.; LAGOUDAS, G.K.; VATANEN, T.; FORNELOS, N.; WILSON, R.; BERTHA, M.; COHEN, M.; GARBER, J.; KHALILI, H.; GEVERS, D.; ANANTHAKRISHNAN, N.A.; KUGATHASAN, S.; LANDER, E.S.; BLAINEY, P.; VLAMAKIS, H.; XAVIER, R.J.; HUTTENHOWER, C. A novel Ruminococcus gnavus clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Med*. 2017 Nov 28; 9(1):103. doi: 10.1186/s13073-017-0490-5. PMID: 29183332; PMCID: PMC5704459.
- HAMER, H.M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F.J.; BRUMMER, R.J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Jan 15; 27(2):104-19. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x. Epub 2007 Oct 25. PMID: 17973645.

- HAMMER, HARPER, DAT, RYAN, PD. PAST: Pacote de software de estatísticas paleontológicas para educação e análise de dados. *Palaeontologia Electronica*. 2001; 4 (1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- HANAMSAGAR, R.; HANKE M.L.; KIELIAN, T. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends Immunol*. 2012 Jul; 33(7):333-42. doi: 10.1016/j.it.2012.03.001. Epub 2012 Apr 21. PMID: 22521509; PMCID: PMC3383346.
- HARMSSEN, H.J.; WILDEBOER-VELOO, A.C.; RAANGS, G.C.; WAGENDORP, A.A.; KLIJN, N.; BINDELS, J.G.; WELLING, G.W. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000 Jan; 30(1):61-7. doi: 10.1097/00005176-200001000-00019. PMID: 10630441.
- HARRIS, S.C.; DEVENDRAN, S.; MÉNDEZ-GARCÍA, C.; MYTHEN, S.M.; WRIGHT, C.L.; FIELDS, C.J.; HERNANDEZ, A.G.; CANN, I.; HYLEMON, P.B.; RIDLON, J.M. Bile acid oxidation by *Eggerthella lenta* strains C592 and DSM 2243T. *Gut Microbes*. 2018 Nov 2; 9(6):523-539. doi: 10.1080/19490976.2018.1458180. Epub 2018 May 24. PMID: 29617190; PMCID: PMC6287680.
- HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; JIN, C.; HAO, L.; MEHAL, W.Z.; STROWIG, T.; THAISS, C.A.; KAU, A.L.; EISENBARTH, S.C.; JURCZAK, M.J.; CAMPOREZ, J.P.; SHULMAN, G.I.; GORDON, J.I.; HOFFMAN, H.M.; FLAVELL, R.A. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012 Feb 1; 482(7384):179-85. doi: 10.1038/nature10809. PMID: 22297845; PMCID: PMC3276682.
- HENKE, M.T.; KENNY, D.J.; CASSILLY, C.D.; VLAMAKIS, H.; XAVIER, R.J.; CLARDY, J. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jun 25; 116(26):12672-12677. doi: 10.1073/pnas.1904099116. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31182571; PMCID: PMC6601261.
- HERMANN-BANK, M.L.; SKOVGAARD, K.; STOCKMARR, A.; LARSEN, N.; MØLBAK, L. The Gut Microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC Genomics*. 2013; 14:788. Published 2013 Nov 14. doi:10.1186/1471-2164-14-788
- HIDALGO, A.; CHANG, J.; JANG, J.E.; PEIRED, A.J.; CHIANG, E.Y.; FRENETTE, P.S. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med*. 2009 Apr; 15(4):384-91. doi: 10.1038/nm.1939. Epub 2009 Mar 22. PMID: 19305412; PMCID: PMC2772164.
- HMPC-HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13; 486(7402):207-14. doi: 10.1038/nature11234. PMID: 22699609; PMCID: PMC3564958.
- HOSPITAL INFANTIL SABARÁ. Calculado online de IMC infantil. Acesso em 30/08/2019 <https://www.hospitalinfantilsabara.org.br/portal-do-paciente-e-da-familia/calculadora-de-imc-infantil/>
- HU, Y.; YANG, X.; QIN, J.; LU, N.; CHENG, G.; WU, N.; PAN, Y.; LI, J.; ZHU, L.; WANG, X.; MENG, Z.; ZHAO, F.; LIU, D.; MA, J.; QIN, N.; XIANG, C.; XIAO, Y.; LI, L.; YANG, H.; WANG, J.; YANG, R.; GAO, G.F.; WANG, J.; ZHU, B. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun*. 2013; 4:2151. doi: 10.1038/ncomms3151. PMID: 23877117.

- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol.* 1998 Sep;180(18):4765-74. Erratum in: *J Bacteriol* 1998 Dec; 180(24):6793. PMID: 9733676; PMCID: PMC107498.
- Illumina 16S metagenomic sequencing library preparation (Illumina Technical Note 15044223 Rev. B). Illumina https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomiclibrary-prep-guide-15044223-b.pdf , 2017.
- ILLUMINA. MiSeq -Guia do sistema. Documento n.º 15027617 v04 PTB Material n.º 20024228, Julho de 2018.
- Integrative HMP. (iHMP) Research Network Consortium. After the Integrative Human Microbiome Project, what's next for the microbiome community? *Nature.* 2019 May;569(7758):599. doi: 10.1038/d41586-019-01674-w. PMID: 31142868.
- ISMAIL, I.H.; OPPEDISANO, F.; JOSEPH, S.J.; BOYLE, R.J.; LICCIARDI, P.V.; ROBINS-BROWNE, R.M.; TANG, M.L. Reduced gut microbial diversity in early life is associated with later development of eczema but not atopy in high-risk infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012 Nov; 23(7):674-81. doi: 10.1111/j.1399-3038.2012.01328.x. Epub 2012 Jul 26. PMID: 22831283.
- IZAOLA, O.; DE LUIS, D.; SAJOUX, I.; DOMINGO, J.C.; VIDAL, M. Inflammation and obesity (lipoinflammation)]. *Nutr Hosp.* 2015 Jun 1; 31(6):2352-8. doi: 10.3305/nh.2015.31.6.8829. PMID: 26040339.
- JAIN, A.; LI, X.H.; CHEN, W.N. Similarities and differences in gut microbiome composition correlate with dietary patterns of Indian and Chinese adults. *AMB Express.* 2018 Jun 23; 8(1):104. doi: 10.1186/s13568-018-0632-1. PMID: 29936607; PMCID: PMC6015586
- JENQ, R.R.; TAUR, Y.; DEVLIN, S.M.; PONCE, D.M.; GOLDBERG, J.D.; AHR, K.F.; LITTMANN, E.R.; LING, L.; GOBOURNE, A.C.; MILLER, L.C.; DOCAMPO, M.D.; PELED, J.U.; ARPAIA, N.; CROSS, J.R.; PEETS, T.K.; LUMISH, M.A.; SHONO, Y.; DUDAKOV, J.Á.; POECK, H.; HANASH, A.M.; BARKER, J.N.; PERALES, M.A.; GIRALT, A.S.; PAMER, E.G.; VAN DEN BRINK, M.R. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Aug;21(8):1373-83. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.04.016. Epub 2015 May 11. PMID: 25977230; PMCID: PMC4516127.
- JERNBERG C, LÖFMARK S, EDLUND C, JANSSON JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology.* 2010 Nov; 156(11):3216-3223. doi: 10.1099/mic.0.040618-0. Epub 2010 Aug 12. PMID: 20705661.
- JERNBERG, C.; LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 2007 May; 1(1):56-66. doi: 10.1038/ismej.2007.3. Erratum in: *ISME J.* 2013 Feb;7(2):456. PMID: 18043614.
- JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M.L.; MARTÍN, R.; ODRIOZOLA, J.M.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J.M. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 2008 Apr;159(3):187-93. doi: 10.1016/j.resmic.2007.12.007. Epub 2008 Jan 11. PMID: 18281199.

- JUNG, T.W.; HWANG, H.J.; HONG, H.C.; YOO, H.J.; BAIK, S.H.; CHOI, K.M. BAIBA attenuates insulin resistance and inflammation induced by palmitate or a high fat diet via an AMPK-PPAR δ -dependent pathway in mice. *Diabetologia*. 2015 Sep;58(9):2096-105. doi: 10.1007/s00125-015-3663-z. Epub 2015 Jun 24. PMID: 26105792.
- KAMEYAMA, K.; ITOH, K. Intestinal colonization by a Lachnospiraceae bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice. *Microbes Environ*. 2014; 29(4):427-30. doi: 10.1264/jsme2.ME14054. Epub 2014 Oct 4. PMID: 25283478; PMCID: PMC4262368
- KAPEL, N.; THOMAS, M.; CORCOS, O.; MAYEUR, C.; BARBOT-TRYSTRAM, L.; BOUHNİK, Y.; JOLY, F. Practical implementation of faecal transplantation. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Nov; 20(11):1098-105. doi: 10.1111/1469-0691.12796. PMID: 25273614.
- KATES, A.E.; JARRETT, O.; SKARLUPKA, J.H.; SETHI, A.; DUSTER, M.; WATSON, L.; SUEN, G.; POULSEN, K.; SAFDAR, N. Household Pet Ownership and the Microbial Diversity of the Human Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Feb 28;10:73. doi: 10.3389/fcimb.2020.00073. PMID: 32185142; PMCID: PMC7058978.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May; 13(5):816-25. doi: 10.1038/sj.cdd.4401850. PMID: 16410796.
- KAZEMTABRIZI, A.; HADDADI, A.; SHAVANDI, M.; HARZANDI, N. Metagenomic investigation of bacteria associated with dental lesions: a cross-sectional study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020 Mar 1; 25(2):e240-e251. doi: 10.4317/medoral.23326. PMID: 32040467; PMCID: PMC7103443.
- KEBSCHULL, J.M.; ZADOR, A.M. Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets. *Nucleic Acids Res*. 2015 Dec 2; 43(21):e143. doi: 10.1093/nar/gkv717. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26187991; PMCID: PMC4666380.
- KIM-SHAPIRO, D.B.; GLADWIN, M.T. Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018; 68(2-3):223-237. doi: 10.3233/CH-189009. PMID: 29614634; PMCID: PMC5911689.
- KONGNUM, K.; TAWEERODJANAKARN, S.; HONGPATTARAKERE, T. Longitudinal characterization of bifidobacterial abundance and diversity profile developed in Thai healthy infants. *Arch Microbiol*. 2020 Mar 17. doi: 10.1007/s00203-020-01856-5. Epub ahead of print. PMID: 32185412.
- KOZICH, J.J.; WESTCOTT, S.L.; BAXTER, N.T.; HIGHLANDER, S.K.; SCHLOSS, P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Sep;79(17):5112-20. doi: 10.1128/AEM.01043-13. Epub 2013 Jun 21. PMID: 23793624; PMCID: PMC3753973. Acesso em 25/05/2019: https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP
- LA REAU, A.J.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; SUEN, G. Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association. *Microb Genom*. 2016 Dec 12; 2(12):e000099. doi: 10.1099/mgen.0.000099. PMID: 28348838; PMCID: PMC5359413.
- LACHA, G.; MORAISA, L. H.; COSTA, A. P. R.; HOELLE, A. A. Envolvimento da flora intestinal na modulação de doenças psiquiátricas. *Vittalle – Revista de Ciências da Saúde*. 2017; 29 (1):64-82. doi: <https://doi.org/10.14295/vittalle.v29i1.6413>

- LARSEN, J.M. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 2017 Aug; 151(4):363-374. doi: 10.1111/imm.12760. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28542929; PMCID: PMC5506432.
- LAZAREVIC, V.; WHITESON, K.; HUSE, S.; HERNANDEZ, D.; FARINELLI, L.; OSTERÅS, M.; SCHRENZEL, J.; FRANÇOIS, P. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods*. 2009 Dec; 79(3):266-71. doi: 10.1016/j.mimet.2009.09.012. Epub 2009 Sep 29. PMID: 19796657; PMCID: PMC3568755.
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 839 p, 2002.
- LI, J.; JIA, H.; CAI, X.; ZHONG, H.; FENG, Q.; SUNAGAWA, S.; ARUMUGAM, M.; KULTIMA, J.R.; PRIFTI, E.; NIELSEN, T.; JUNCKER, A.S.; MANICHANH, C.; CHEN, B.; ZHANG, W.; LEVENEZ, F.; WANG, J.; XU, X.; XIAO, L.; LIANG, S.; ZHANG, D.; ZHANG, Z.; CHEN, W.; ZHAO, H.; AL-AAMA, J.Y.; EDRIS, S.; YANG, H.; WANG, J.; HANSEN, T.; NIELSEN, H.B.; BRUNAK, S.; KRISTIANSEN, K.; GUARNER, F.; PEDERSEN, O.; DORÉ, J.; EHRLICH, S.D. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug; 32(8):834-41. doi: 10.1038/nbt.2942. Epub 2014 Jul 6. PMID: 24997786.
- LI, J.; ZHAO, F.; WANG, Y.; CHEN, J.; TAO, J.; TIAN, G.; WU, S.; LIU, W.; CUI, Q.; GENG, B.; ZHANG, W.; WELDON, R.; AUGUSTE, K.; YANG, L.; LIU, X.; CHEN, L.; YANG, X.; ZHU, B.; CAI, J. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017 Feb 1;5(1):14. doi: 10.1186/s40168-016-0222-x. PMID: 28143587; PMCID: PMC5286796.
- LIM, M.Y.; YOU, H.J.; YOON, H.S.; KWON, B.; LEE, J.Y.; LEE, S.; SONG, Y.M.; LEE, K.; SUNG, J.; K.O, G. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*. 2017 Jun; 66(6):1031-1038. doi: 10.1136/gutjnl-2015-311326. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27053630.
- LIM, S.H.; FAST, L.; MORRIS, A. Sick cell vaso-occlusive crisis: it's a gut feeling. *J Transl Med*. 2016 Dec 1;14(1):334. doi: 10.1186/s12967-016-1092-5. PMID: 27906010; PMCID: PMC5134241.
- LIMA, M.S.C.S.; SOUZA, C.A.S.; PEDERASSI, J. Qual Índice de Diversidade Usar? *Cadernos UniFOA, Volta Redonda*. 2016 abr; 30:129-138.
- LIN, A.; BIK, E.M.; COSTELLO, E.K.; DETHLEFSEN, L.; HAQUE, R.; RELMAN, D.A.; SINGH, U. Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States. *PLoS One*. 2013; 8(1):e53838. doi: 10.1371/journal.pone.0053838. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23349750; PMCID: PMC3551965.
- LIU, M.; KOH, H.; KURTZ, Z.D.; BATTAGLIA, T.; PEBENITO, A.; LI, H.; NAZZAL, L.; BLASER, M.J. Oxalobacter formigenes-associated host features and microbial community structures examined using the American Gut Project. *Microbiome*. 2017 Aug 25; 5(1):108. doi: 10.1186/s40168-017-0316-0. PMID: 28841836; PMCID: PMC5571629.
- LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. São José do Rio Preto. 2007 Sept; 29(3):247-258. Acesso em 13 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300011>.

- LOPES, C.L.R.; SANTOS G.M.; COELHO, F.O.A.M. A prevalência de sinais e sintomas de disbiose intestinal em Pacientes de uma clínica em Tersina-Pi. C&D-Revista Eletrônica da FAINOR, Vitória da Conquista. 2017 set./dez; 10(3):280 -292.
- LÓPEZ-GARCÍA, A.; PINEDA-QUIROGA, C.; ATXAERANDIO, R.; PÉREZ, A.; HERNÁNDEZ, I.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, A.; GONZÁLEZ-RECIO, O. Comparison of Mothur and QIIME for the Analysis of Rumen Microbiota Composition Based on 16S rRNA Amplicon Sequences. *Front Microbiol.* 2018 Dec 13;9:3010. doi: 10.3389/fmicb.2018.03010. PMID: 30619117; PMCID: PMC6300507.
- LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008 May; 42(2):145-151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18304834.
- MACHADO, D.F.; SILVA, R.R.; FANCHIOTTI, F.E.; COSTA, N.M.B. Probiotics, prebiotics and symbiotics and effects on calcium bioavailability. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* 2001 dez; 22:73-83.
- MACHO FERNANDEZ, E.; POT, B.; GRANGETTE, C. Beneficial effect of probiotics in IBD: are peptidoglycan and NOD2 the molecular key effectors? *Gut Microbes.* 2011 Sep 1;2(5):280-6. doi: 10.4161/gmic.2.5.18255. Epub 2011 Sep 1. PMID: 22067939.
- MANCABELLI, L.; MILANI, C.; LUGLI, G.A.; TURRONI, F.; COCCONI, D.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017 Dec 1; 93(12). doi: 10.1093/femsec/fix153. PMID: 29126267.
- MANFREDINI, V.; CASTRO, S.; WAGNER, S. C.; BENFATO, M. S. A fisiopatologia da anemia falciforme. *Infarma - Ciências Farmacêuticas.* 2013 jan.; 19(1/2):3-6. ISSN 2318-9312. Disponível em: <<http://www.revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=216>>. Acesso em: 13 apr. 2020.
- MARTIN, R.; NAUTA, A.J.; BEN AMOR, K.; KNIPPELS, L.M.; KNOL, J.; GARSSSEN, J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes.* 2010 Nov;1(4):367-82. doi: 10.3920/BM2010.0027. PMID: 21831776.
- MCCANN, K.S. The diversity-stability debate. *Nature.* 2000 May 11; 405(6783):228-33. doi: 10.1038/35012234. PMID: 10821283.
- MEEHAN, C.J.; BEIKO, R.G. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biol Evol.* 2014 Mar; 6(3):703-13. doi: 10.1093/gbe/evu050. PMID: 24625961; PMCID: PMC3971600.
- MELLO, C.S.; CARMO-RODRIGUES, M.S.; FILHO, H.B.; MELLI, L.C.; TAHAN, S.; PIGNATARI, A.C.; DE MORAIS, M.B. Gut Microbiota Differences in Children From Distinct Socioeconomic Levels Living in the Same Urban Area in Brazil. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016 Nov; 63(5):460-465. doi: 10.1097/MPG.0000000000001186. PMID: 26982745.
- MELO, A.S. O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? *Biota Neotrop.* [online]. 2008 July/Sept; 8(3):21-27. ISSN 1676-0611. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032008000300001>.
- MIN, Y.; MA, X.; SANKARAN, K.; RU, Y.; CHEN, L.; BAIOCCHI, M.; ZHU, S. Sex-specific association between gut microbiome and fat distribution. *Nat Commun.* 2019 Jun

- 3;10(1):2408. doi: 10.1038/s41467-019-10440-5. PMID: 31160598; PMCID: PMC6546740.
- MOBEEN, F.; SHARMA, V.; TULIKA, P. Enterotype Variations of the Healthy Human Gut Microbiome in Different Geographical Regions. *Bioinformation*. 2018 Dec 29; 14(9):560-573. doi: 10.6026/97320630014560. PMID: 31223215; PMCID: PMC6563668.
- MODI, S.R.; COLLINS, J.J.; RELMAN, D.A. Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Invest*. 2014 Oct; 124(10):4212-8. doi: 10.1172/JCI72333. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25271726; PMCID: PMC4191029.
- MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. *J. Pediatr*. 2006 Nov; 82(5):189-197. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572006000700009>. Acessado em 13 Abril 2020.
- MOROTOMI, M.; NAGAI, F.; WATANABE, Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012 Jan; 62(Pt 1):144-9. doi: 10.1099/ijs.0.026989-0. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21357455.
- MOSCA, F.; GIANNÌ, M.L. Human milk: composition and health benefits. *Pediatr Med Chir*. 2017 Jun 28; 39(2):155. doi: 10.4081/pmc.2017.155. PMID: 28673076.
- NAPPI, G.U.; RIBEIRO-CUNHA, M.R.; COELHO, J.V.; JOKL, L. Validação de métodos para determinação dos ácidos fítico e oxálico em multimistura. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2006 Dec.; 26(4): 811-820. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400016>. Acessado em 13 Abril 2020.
- NASERIBAFROUEI, A.; HESTAD, K.; AVERSHINA, E.; SEKELJA, M.; LINLØKKEN, A.; WILSON, R.; RUDI, K. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil*. 2014 Aug;26(8):1155-62. doi: 10.1111/nmo.12378. Epub 2014 Jun 1. PMID: 24888394.
- NEPELSKA, M.; CULTRONE, A.; BÉGUET-CRESPEL, F.; LE ROUX, K.; DORÉ, J.; ARULAMPALAM, V.; BLOTTIÈRE, H.M. Butyrate produced by commensal bacteria potentiates phorbol esters induced AP-1 response in human intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52869. doi: 10.1371/journal.pone.0052869. Epub 2012 Dec 27. PMID: 23300800; PMCID: PMC3531367.
- NOGUEIRA, Z.D.; MENDES, C.M.C.; BOA-SORTE, N.; AMORIM T.; LEITE, M.E.Q.. Alterações antropométricas em crianças com doença falciforme. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2014 set./dez.; 13(3):393-397.
- NUZZO, D. V. P. DI; SILVANA F. F.; Anemia falciforme e infecções. *Jornal de Pediatria*. 2004; 80(5): 347-354. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572004000600004>. Acessado em 10 março 2019.
- O'MAHONY, S.M.; CLARKE, G.; BORRE, Y.E.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res*. 2015 Jan 15; 277:32-48. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.027. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25078296.
- O'MAHONY, S.M.; FELICE, V.D.; NALLY, K.; SAVIGNAC, H.M.; CLAEISSON, M.J.; SCULLY, P.; WOZNICKI, J.; HYLAND, N.P.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E.M.; MARCHESI, J.R.; O'TOOLE, P.W.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. Disturbance of the gut microbiota in early-life

- selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *Neuroscience*. 2014 Sep 26; 277:885-901. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.054. Epub 2014 Aug 1. PMID: 25088912.
- PAIVA-OLIVEIRA, E.L.; SILVA, A.C; SILVA, R.M.; SEVENINI, L. A.; DE MELO, H. A.; LAGROTA-CANDIDO, J.; QUIRICO-SANTOS, T. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. *R Ci Med Biol*. 2012 jan./abr; 11(1):96-102. doi: <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v11i1.6245>
- PENNA, F.J.; NICOLLI, J.R. Influência do colostro na colonização bacteriana normal do trato digestivo do recém-nascido [Influence of colostrum on normal bacterial colonization of the neonatal gastrointestinal tract]. *J Pediatr (Rio J)*. 2001 Jul-Aug; 77(4):251-2. doi: 10.2223/jped.228. PMID: 14647852.
- PERLEY, M.J.; KIPNIS, D.M. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1967 Dec; 46(12):1954-62. doi: 10.1172/JCI105685. PMID: 6074000; PMCID: PMC292948.
- PERONI, N.; HERNÁNDEZ, M. I. M. *Ecologia de Populações e Comunidades*. Florianópolis: CCB/EAD/UFSC, 2011. ISBN 978-85-61485-39-9
- PINHEIRO, B. C.; BITTAR, C. M. L. Percepções, expectativas e conhecimentos sobre o parto normal: relatos de experiência de parturientes e dos profissionais de saúde. *Aletheia*, 2012 jan./abr; 37:212-227.
- PLATT, O.S.; BRAMBILLA, D.J.; ROSSE, W.F.; MILNER, P.F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M.H.; KLUG, P.P. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994 Jun 9; 330(23):1639-44. doi: 10.1056/NEJM199406093302303. PMID: 7993409.
- PNG, C.W.; LINDÉN, S.K.; GILSHENAN, K.S.; ZOETENDAL, E.G.; MCSWEENEY, C.S.; SLY, L.I.; MCGUCKIN, M.A.; FLORIN, T.H. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol*. 2010 Nov; 105(11):2420-8. doi: 10.1038/ajg.2010.281. Epub 2010 Jul 20. PMID: 20648002.
- PROCTOR L. Priorities for the next 10 years of human microbiome research. *Nature*. 2019 May; 569(7758):623-625. doi: 10.1038/d41586-019-01654-0. PMID: 31142863.
- PUSCEDDU, M.M.; GAREAU, M.G. Visceral pain: gut microbiota, a new hope? *J Biomed Sci*. 2018 Oct 11; 25(1):73. doi: 10.1186/s12929-018-0476-7. PMID: 30309367; PMCID: PMC6182804.
- QUÉVRAIN, E.; MAUBERT, M.A.; MICHON, C.; CHAIN, F.; MARQUANT, R.; TAILHADES, J.; MIQUEL, S.; CARLIER, L.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; PIGNEUR, B.; LEQUIN, O.; KHARRAT, P.; THOMAS, G.; RAINTEAU, D.; AUBRY, C.; BREYNER, N.; AFONSO, C.; LAVIELLE, S.; GRILL, J.P.; CHASSAING, G.; CHATEL, J.M.; TRUGNAN, G.; XAVIER, R.; LANGELLA, P.; SOKOL, H.; SEKSIK, P. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*. 2016 Mar;65(3):415-425. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307649. Epub 2015 Jun 4. PMID: 26045134; PMCID: PMC5136800.
- RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71:635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414. Epub 2001 Nov 9. PMID: 12045108; PMCID: PMC2569852.

- RAGHAVENDRA, P.; HALAMI, P.M. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. *Int J Food Microbiol.* 2009 Jul 31; 133(1-2):129-34. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.006. Epub 2009 May 9. PMID: 19481282.
- RAIZEL, R. *et al.* Efeitos de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Revista Ciências & Saúde.* 2011 jul./dez.; 4(2):66-74. doi: <http://dx.doi.org/10.15448/1983-652X.2011.2.8352>
- REN, X.; GAMALLAT, Y.; LIU, D.; ZHU, Y.; MEYIAH, A.; YAN, C.; SHANG, D.; XIN, Y. The distribution characteristics of intestinal microbiota in children with community-acquired pneumonia under five Years of age. *Microb Pathog.* 2020 Feb 11;142:104062. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104062. Epub ahead of print. PMID: 32058024.
- RHEE, S.J.; KIM, H.; LEE, Y.; LEE, H.J.; PARK, C.H.K.; YANG, J.; KIM, Y.K.; KYM, S.; AHN, Y.M. Comparison of serum microbiome composition in bipolar and major depressive disorders. *J Psychiatr Res.* 2020 Apr;123:31-38. doi: 10.1016/j.jpsychires.2020.01.004. Epub 2020 Jan 21. PMID: 32028208.
- RIETSCHER, E.T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F.U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A.J.; ZÄHRINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994 Feb; 8(2):217-25. doi: 10.1096/fasebj.8.2.8119492. PMID: 8119492.
- RIGOTTIER-GOIS L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J.* 2013 Jul; 7(7):1256-61. doi: 10.1038/ismej.2013.80. Epub 2013 May 16. PMID: 23677008; PMCID: PMC3695303.
- RÍOS-COVIÁN, D.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G.; SALAZAR, N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol.* 2016 Feb 17;7:185. doi: 10.3389/fmicb.2016.00185. PMID: 26925050; PMCID: PMC4756104.
- RODGERS, G.P. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. *Semin Hematol.* 1997 Jul; 34(3):2-7. PMID: 9317195.
- RODRIGUES, F.A.P.; MEDEIROS, P.H.Q.S.; PRATA, M.M.G.; LIMA, A.Â.M. Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica: Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal. *Blucher.*2016. 441-478. ISBN: 9788580391893, doi 10.5151/9788580391893-18
- ROSA, B.A.; HALLSWORTH-PEPIN, K.; MARTIN, J.; WOLLAM, A.; MITREVA, M. Genome Sequence of *Christensenella minuta* DSM 22607T. *Genome Announc.* 2017 Jan 12; 5(2):e01451-16. doi: 10.1128/genomeA.01451-16. PMID: 28082495; PMCID: PMC5256218.
- RUPPÉ, E.; ANDREMONT, A. Causes, consequences, and perspectives in the variations of intestinal density of colonization of multidrug-resistant enterobacteria. *Front Microbiol.* 2013 May 28; 4:129. doi: 10.3389/fmicb.2013.00129. PMID: 23755045; PMCID: PMC3664761.
- SAAD, S. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2006 jan./mar.; 42(1):1-16. doi: 10.1590/S1516-93322006000100002.
- SAKAKIBARA, S.; YAMAUCHI, T.; OSHIMA, Y.; TSUKAMOTO, Y.; KADOWAKI, T. Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice.

- Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jun 2; 344(2):597-604. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.03.176. Epub 2006 Apr 5. PMID: 16630552.
- SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- SAMUEL, B.S.; HANSEN, E.E.; MANCHESTER, J.K.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; FULTON, R.; LATREILLE, P.; KIM, K.; WILSON, R.K.; GORDON, J.I. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. Version 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 19; 104(25):10643-8. doi: 10.1073/pnas.0704189104. Epub 2007 Jun 11. PMID: 17563350; PMCID: PMC1890564.
- SANTOS, T.T.; VARAVALHO, M.A. A importância de probiótico para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. *Revista Científica do ITPAC*. 2011 jan. 4(1): 40-49. ISSN 1983-6708
- SATOKARI, R.; FUENTES, S.; MATTILA, E.; JALANKA, J.; DE VOS, W.M.; ARKKILA, P. Fecal transplantation treatment of antibiotic-induced, noninfectious colitis and long-term microbiota follow-up. *Case Rep Med*. 2014; 2014:913867. doi: 10.1155/2014/913867. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25548572; PMCID: PMC4274837.
- SATOKARI, R.; GRÖNROOS, T.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol*. 2009 Jan; 48(1):8-12. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02475.x. Epub 2008 Oct 17. PMID: 19018955.
- SCHOLTENS, P.A.; OOZEER, R.; MARTIN, R.; AMOR K.B.; KNOL, J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012; 3:425-47. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101120. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22224552.
- SCHOLZ, J; WOOLF, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 2007 Nov; 10(11):1361-8. doi: 10.1038/nn1992. PMID: 17965656.
- SCHUMANN, A.; NUTTEN, S.; DONNICOLA, D.; COMELLI, E.M.; MANSOURIAN, R.; CHERBUT, C.; CORTHESEY-THEULAZ, I.; GARCIA-RODENAS, C. Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics*. 2005 Oct 17; 23(2):235-45. doi: 10.1152/physiolgenomics.00057.2005. Epub 2005 Aug 30. PMID: 16131529.
- SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE-SESAB. Superintendência de Vigilância Sanitária-Suvisa. Informações de Saúde: Natalidade, 2006-2016. Disponível na Internet: <http://www3.saude.ba.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/nvba.def>. Acesso em 20 out. 2016.
- SHANKAR, V.; GOUDA, M.; MONCIVAIZ, J.; GORDON, A.; REO, N.V.; HUSSEIN, L.; PALIY, O. Differences in Gut Metabolites and Microbial Composition and Functions between Egyptian and U.S. Children Are Consistent with Their Diets. *mSystems*. 2017 Feb 7; 2(1):e00169-16. doi: 10.1128/mSystems.00169-16. PMID: 28191503; PMCID: PMC5296411.
- SHELTON, C.D.; BYNDLOSS, M.X. Gut epithelial metabolism as a key driver of intestinal dysbiosis associated with noncommunicable diseases. *Infect Immun*. 2020 Mar 2; IAI.00939-19. doi: 10.1128/IAI.00939-19. Epub ahead of print. PMID: 32122941.
- SHEN, J.; TONG, X.; SUD, N.; KHOOND, R.; SONG, Y.; MALDONADO-GOMEZ, M.X.; WALTER, J.; SU, Q. Low-Density Lipoprotein Receptor Signaling Mediates the

- Triglyceride-Lowering Action of *Akkermansia muciniphila* in Genetic-Induced Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016 Jul; 36(7):1448-56. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307597. Epub 2016 May 26. PMID: 27230129.
- SHI, Y.; KELLINGRAY, L.; ZHAI, Q.; GALL, G.L.; NARBAD, A.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W. Structural and Functional Alterations in the Microbial Community and Immunological Consequences in a Mouse Model of Antibiotic-Induced Dysbiosis. *Front Microbiol.* 2018 Aug 21;9:1948. doi: 10.3389/fmicb.2018.01948. PMID: 30186263; PMCID: PMC6110884.
- SHIN, J.H.; PARK, Y.H.; SIM, M.; KIM, A.S.; JOUNG, H.; SHIN, D.M. Serum level of sex steroid hormone is associated with diversity and profiles of human gut microbiome. *Res Microbiol.* 2019 Jun-Aug; 170(4-5):192-201. doi: 10.1016/j.resmic.2019.03.003. Epub 2019 Mar 30. PMID: 30940469.
- SILVA, H.S.; RAMOS, R.J.; CIROLINI, A.; MIOTTO, M.; BASSEGIO, A.M.; VIEIRA, C.R.W. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse alimentar. *Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo.* 2010 ; 69(4):584-7.
- SILVA, W.S.; DE OLIVEIRA, R.F.; RIBEIRO, S.B.; DA SILVA, I.B.; DE ARAÚJO, E.M.; BAPTISTA, A.F. Screening for Structural Hemoglobin Variants in Bahia, Brazil. *Int J Environ Res Public Health.* 2016 Feb 18; 13(2):225. doi: 10.3390/ijerph13020225. PMID: 26901212; PMCID: PMC4772245.
- SIMONYTE SJÖDIN, K.; VIDMAN, L.; RYDÉN, P.; WEST, C.E. Emerging evidence of the role of gut microbiota in the development of allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2016 Aug;16(4):390-5. doi: 10.1097/ACI.0000000000000277. PMID: 27253486.
- SINGER, E.; BUSHNELL, B.; COLEMAN-DERR, D.; BOWMAN, B.; BOWERS, R.M.; LEVY, A.; GIES, E.A.; CHENG, J.F.; COPELAND, A.; KLENK, H.P.; HALLAM, S.J.; HUGENHOLTZ, P.; TRINGE, S.G.; WOYKE, T. High-resolution phylogenetic microbial community profiling. *ISME J.* 2016 Aug; 10(8):2020-32. doi: 10.1038/ismej.2015.249. Epub 2016 Feb 9. PMID: 26859772; PMCID: PMC5029162.
- SINGH, R.; NIEUWDORP, M.; TEN BERGE, I.J.; BEMELMAN, F.J.; GEERLINGS, S.E. The potential beneficial role of faecal microbiota transplantation in diseases other than *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Nov;20(11):1119-25. doi: 10.1111/1469-0691.12799. Epub 2014 Nov 7. PMID: 25274035.
- SMITH, E. P.; VAN BELLE, G. Nonparametric Estimation of Species Richness. *International Biometric Society.* 1984 mar.; 40(1):119–129. www.jstor.org/stable/2530750. Accessed 3 Apr. 2020.
- SOKOL, H.; PIGNEUR, B.; WATTERLOT, L.; LAKHDARI, O.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; GRATADOUX, J.J.; BLUGEON, S.; BRIDONNEAU, C.; FURET, J.P.; CORTHER, G.; GRANGETTE, C.; VASQUEZ, N.; POCHART, P.; TRUGNAN, G.; THOMAS, G.; BLOTTIÈRE, H.M.; DORÉ, J.; MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; LANGELLA, P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 28;105(43):16731-6. doi: 10.1073/pnas.0804812105. Epub 2008 Oct 20. PMID: 18936492; PMCID: PMC2575488.
- SOKOL, H.; SEKSIK, P.; FURET, J.P.; FIRMESSE, O.; NION-LARMURIER, I.; BEAUGERIE, L.; COSNES, J.; CORTHER, G.; MARTEAU, P.; DORÉ, J. Low counts of

- Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Aug; 15(8):1183-9. doi: 10.1002/ibd.20903. PMID: 19235886.
- SOMMER, F.; ANDERSON, J.M.; BHARTI, R.; RAES, J.; ROSENSTIEL, P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Oct; 15(10):630-638. doi: 10.1038/nrmicro.2017.58. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28626231.
- STILLING, R.M.; VAN DE WOUW, M.; CLARKE, G.; STANTON, C.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochem Int.* 2016 Oct; 99:110-132. doi: 10.1016/j.neuint.2016.06.011. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27346602.
- STROWIG, T.; HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; FLAVELL, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012 Jan 18; 481(7381):278-86. doi: 10.1038/nature10759. PMID: 22258606.
- STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2004 Oct 9-15;364(9442):1343-60. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17192-4. PMID: 15474138.
- SUAU, A.; ROCHET, V.; SGHIR, A.; GRAMET, G.; BREWAEYS, S.; SUTREN, M.; RIGOTTIER-GOIS, L.; DORÉ, J. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst Appl Microbiol.* 2001 Apr; 24(1):139-45. doi: 10.1078/0723-2020-00015. PMID: 11403393.
- SUN, L.; JIA, H.; LI, J.; YU, M.; YANG, Y.; TIAN, D.; ZHANG, H.; ZOU, Z. Cecal Gut Microbiota and Metabolites Might Contribute to the Severity of Acute Myocardial Ischemia by Impacting the Intestinal Permeability, Oxidative Stress, and Energy Metabolism. *Front Microbiol.* 2019 Aug 2; 10:1745. doi: 10.3389/fmicb.2019.01745. PMID: 31428065; PMCID: PMC6687875.
- SUZUKI T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Feb; 70(4):631-59. doi: 10.1007/s00018-012-1070-x. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22782113.
- SYNGAI, G. G.; BARMAN, P.; BHARALI, R.; DEY, S. BLAST: An introductory tool for students to Bioinformatics Applications. *Keanean Journal of Science* 2013; 2:67-76. ISSN 2321 – 6077.
- TAKAHASHI, S.; TOMITA, J.; NISHIOKA, K.; HISADA, T.; NISHIJIMA, M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One.* 2014 Aug 21; 9(8):e105592. doi: 10.1371/journal.pone.0105592. PMID: 25144201; PMCID: PMC4140814.
- TANG, R.; JIANG, Y.; TAN, A.; YE, J.; XIAN, X.; XIE, Y.; WANG, Q.; YAO, Z.; MO, Z. 16S rRNA gene sequencing reveals altered composition of gut microbiota in individuals with kidney stones. *Urolithiasis.* 2018 Nov; 46(6):503-514. doi: 10.1007/s00240-018-1037-y. Epub 2018 Jan 20. PMID: 29353409.
- TAUR, Y.; JENQ, R.R.; PERALES, M.A.; LITTMANN, E.R.; MORJARIA, S.; LING, L.; NO, D.; GOBOURNE, A.; VIALE, A.; DAHI, P.B.; PONCE, D.M.; BARKER, J.N.; GIRALT, S.; VAN DEN BRINK, M.; PAMER, E.G. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2014 Aug 14; 124(7):1174-82. doi: 10.1182/blood-2014-02-554725. Epub 2014 Jun 17. PMID: 24939656; PMCID: PMC4133489.

- THOMAS, S.; IZARD, J.; WALSH, E.; BATICH, K.; CHONGSATHIDKIET, P.; CLARKE, G.; SELA, DA.; MULLER, A.J.; MULLIN, J.M.; ALBERT, K.; GILLIGAN, J.P.; DIGUILIO, K.; DILBAROVA, R.; ALEXANDER, W.; PRENDERGAST, G.C. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Res.* 2017 Apr 15;77(8):1783-1812. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2929. Epub 2017 Mar 14. PMID: 28292977; PMCID: PMC5392374.
- TORRES-FUENTES, C.; SCHELLEKENS, H.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017 Oct; 2(10):747-756. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30147-4. Epub 2017 Aug 24. PMID: 28844808.
- TREMBLAY, J.; SINGH, K.; FERN, A.; KIRTON, E.S.; HE, S.; WOYKE, T.; LEE, J.; CHEN, F.; DANGL, J.L.; TRINGE, S.G. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol.* 2015 Aug 4; 6:771. doi: 10.3389/fmicb.2015.00771. PMID: 26300854; PMCID: PMC4523815.
- TUIN, A.; HUIZINGA-VAN DER VLAG, A.; VAN LOENEN-WEEMAES, A.M.; MEIJER, D.K.; POELSTRA, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Feb; 290(2):G377-85. doi: 10.1152/ajpgi.00147.2005. Epub 2005 Oct 13. PMID: 16223948.
- TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006 Dec 21; 444(7122):1027-31. doi: 10.1038/nature05414. PMID: 17183312.
- TURRONI, F.; RIBBERA, A.; FORONI, E.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008 Jun; 94(1):35-50. doi: 10.1007/s10482-008-9232-4. Epub 2008 Mar 13. PMID: 18338233.
- UBEDA, C.; BUCCI, V.; CABALLERO, S.; DJUKOVIC, A.; TOUSSAINT, N.C.; EQUINDA, M.; LIPUMA, L.; LING, L.; GOBOURNE, A.; NO, D.; TAUR, Y.; JENQ, R.R.; VAN DEN BRINK, M.R.; XAVIER, J.B.; PAMER, E.G. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun.* 2013 Mar; 81(3):965-73. doi: 10.1128/IAI.01197-12. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23319552; PMCID: PMC3584866.
- UDALL, J.N.; PANG, K.; FRITZE, L.; KLEINMAN, R.; WALKER, W.A. Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res.* 1981 Mar; 15(3):241-4. doi: 10.1203/00006450-198103000-00008. PMID: 7220146.
- VALLES-COLOMER, M.; FALONY, G.; DARZI, Y.; TIGCHELAAR, E.F.; WANG, J.; TITO, R.Y.; SCHIWECK, C.; KURILSHIKOV, A.; JOOSSENS, M.; WIJMENGA, C.; CLAES, S.; VAN OUDENHOVE, L.; ZHERNAKOVA, A.; VIEIRA-SILVA, S.; RAES, J. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nat Microbiol.* 2019 Apr;4(4):623-632. doi: 10.1038/s41564-018-0337-x. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30718848.
- VAMANU, E.; PELINESCU, D.; SARBU, I. Comparative Fingerprinting of the Human Microbiota in Diabetes and Cardiovascular Disease. *J Med Food.* 2016 Dec; 19(12):1188-1195. doi: 10.1089/jmf.2016.0085. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27898282.
- VANGAY, P.; WARD, T.; GERBER, J.S.; KNIGHTS, D. Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. *Cell Host Microbe.* 2015 May 13; 17(5):553-64. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.006. PMID: 25974298; PMCID: PMC5555213.

- VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, 2001; 24(4): 146-154.
- VICHINSKY, E.P.; STYLES, L.A.; COLANGELO, L.H.; WRIGHT, E.C.; CASTRO, O.; NICKERSON, B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. *Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood*. 1997 Mar 1; 89(5):1787-92. PMID: 9057664.
- WALKER, A.W.; INCE, J.; DUNCAN, S.H.; WEBSTER, L.M.; HOLTROP, G.; ZE, X.; BROWN, D.; STARES, M.D.; SCOTT, P.; BERGERAT, A.; LOUIS, P.; MCINTOSH, F.; JOHNSTONE, A.M.; LOBLEY, G.E.; PARKHILL, J.; FLINT, H.J. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*. 2011 Feb;5(2):220-30. doi: 10.1038/ismej.2010.118. Epub 2010 Aug 5. PMID: 20686513; PMCID: PMC3105703.
- WALKER, W.A. Development of the intestinal mucosal barrier. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002 May-Jun;34 Suppl 1:S33-9. doi: 10.1097/00005176-200205001-00009. PMID: 12082386.
- WALL, R.; ROSS, R.P.; RYAN, C.A.; HUSSEY, S.; MURPHY, B.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Role of gut microbiota in early infant development. *Clin Med Pediatr*. 2009 Mar 4; 3:45-54. doi: 10.4137/cmped.s2008. PMID: 23818794; PMCID: PMC3676293.
- WAN, L.; GE, W.R.; ZHANG, S.; SUN, Y.L.; WANG, B.; YANG, G. Case-Control Study of the Effects of Gut Microbiota Composition on Neurotransmitter Metabolic Pathways in Children With Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Front Neurosci*. 2020 Feb 18;14:127. doi: 10.3389/fnins.2020.00127. PMID: 32132899; PMCID: PMC7040164.
- WAN, Y.; TONG, W.; ZHOU, R.; LI, J.; YUAN, J.; WANG, F.; LI, D . Habitual animal fat consumption in shaping gut microbiota and microbial metabolites. *Food Funct*. 2019 Dec 11; 10(12):7973-7982. doi: 10.1039/c9fo01490j. PMID: 31776537.
- WAN, Y.; YUAN, J.; LI, J.; LI, H.; YIN, K.; WANG, F.; LI, D. Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. *Clin Nutr*. 2020 Feb 15:S0261-5614(20)30062-5. doi: 10.1016/j.clnu.2020.02.014. Epub ahead of print. PMID: 32164980.
- WANG, J.; XIONG, K.; ZHAO, S.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; XU, L.; MA, A. Long-Term Effects of Multi-Drug-Resistant Tuberculosis Treatment on Gut Microbiota and Its Health Consequences. *Front Microbiol*. 2020 Jan 30;11:53. doi: 10.3389/fmicb.2020.00053. PMID: 32082283; PMCID: PMC7002438.
- WANG, L.; LLORENTE, C.; HARTMANN, P.; YANG, A.M.; CHEN, P.; SCHNABL, B. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J Immunol Methods*. 2015 Jun; 421:44-53. doi: 10.1016/j.jim.2014.12.015. Epub 2015 Jan 13. PMID: 25595554; PMCID: PMC4451427.
- WANG, M.; KARLSSON, C.; OLSSON, C.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A.E.; STRACHAN, D.P.; MARTRICARDI, P.M.; ABERG, N.; PERKIN, M.R.; TRIPODI, S.; COATES, A.R.; HESSELMAR, B.; SAALMAN, R.; MOLIN, G.; AHRNÉ, S. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jan;121(1):129-34. doi: 10.1016/j.jaci.2007.09.011. Epub 2007 Oct 29. PMID: 18028995.
- WANG, Q.; HAO, C.; YAO, W.; ZHU, D.; LU, H.; LI, L.; MA, B.; SUN, B.; XUE, D.; ZHANG, W. Intestinal flora imbalance affects bile acid metabolism and is associated with gallstone

- formation. *BMC Gastroenterol.* 2020 Mar 6; 20(1):59. doi: 10.1186/s12876-020-01195-1. PMID: 32143645; PMCID: PMC7060658.
- WATERS, J.L.; LEY, R.E. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* 2019 Oct 28;17(1):83. doi: 10.1186/s12915-019-0699-4. PMID: 31660948; PMCID: PMC6819567.
- WEXLER, H.M. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Oct;20(4):593-621. doi: 10.1128/CMR.00008-07. PMID: 17934076; PMCID: PMC2176045.
- WIDGEROW, A.D.; KALARIA, S. Pain mediators and wound healing--establishing the connection. *Burns.* 2012 Nov; 38(7):951-9. doi: 10.1016/j.burns.2012.05.024. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22738827.
- WONG, J.M.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C.W.; EMAM, A.; JENKINS, D.J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006 Mar; 40(3):235-43. doi: 10.1097/00004836-200603000-00015. PMID: 16633129.
- WOPEREIS, H.; OOZEER, R.; KNIPPING, K.; BELZER, C.; KNOL, J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014 Aug; 25(5):428-38. doi: 10.1111/pai.12232. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24899389.
- YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics.* 2016 Mar 22;17:135. doi: 10.1186/s12859-016-0992-y. PMID: 27000765; PMCID: PMC4802574.
- YANG, R.; LIU, P.; YE, W. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of tree peony (*Paeonia Sect. Moutan*) roots and leaves. *Braz J Microbiol.* 2017 Oct-Dec; 48(4):695-705. doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.009. Epub 2017 Jun 2. PMID: 28606427; PMCID: PMC5628320.
- 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, J.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.* 2012 May 9; 486(7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053. PMID: 22699611; PMCID: PMC3376388.
- YILMAZ, P.; PARFREY, L.W.; YARZA, P.; GERKEN, J.; PRUESSE, E.; QUAST, C.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; LUDWIG, W.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D643-8. doi: 10.1093/nar/gkt1209. Epub 2013 Nov 28. PMID: 24293649; PMCID: PMC3965112.
- ZAGO, M. A.; PINTO, A. C.S.. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007 sept.; 29(3):207-214. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300003>. Acessado em 14 abril 2020.
- ZE, X.; DUNCAN, S.H.; LOUIS, P.; FLINT, H.J. Ruminococcus bromii is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* 2012 Aug; 6(8):1535-43. doi: 10.1038/ismej.2012.4. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22343308; PMCID: PMC3400402.

- ZHANG, C.; ZHANG, M.; WANG, S.; HAN, R.; CAO, Y.; HUA, W.; MAO, Y.; ZHANG, X.; PANG, X.; WEI, C.; ZHAO, G.; CHEN, Y.; ZHAO, L. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J.* 2010 Feb; 4(2):232-41. doi: 10.1038/ismej.2009.112. Epub 2009 Oct 29. Erratum in: *ISME J.* 2010 Feb;4(2):312-3. PMID: 19865183.
- ZHANG, D.; CHEN, G.; MANWANI, D.; MORTHA, A.; XU, C.; FAITH, J.J.; BURK, R.D.; KUNISAKI, Y.; JANG, J.E.; SCHEIERMANN, C.; MERAD, M.; FRENETTE, P.S. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature.* 2015 Sep 24;525(7570):528-32. doi: 10.1038/nature15367. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26374999; PMCID: PMC4712631.
- ZHANG, M.; QIU, X.; ZHANG, H.; YANG, X.; HONG, N.; YANG, Y.; CHEN, H.; YU, C. *Faecalibacterium prausnitzii* inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PLoS One.* 2014 Oct 2; 9(10):e109146. doi: 10.1371/journal.pone.0109146. PMID: 25275569; PMCID: PMC4183556.
- ZHANG, P.P.; LI, L.L.; HAN, X.; LI, Q.W.; ZHANG, X.H.; LIU, J.J.; WANG, Y. Fecal microbiota transplantation improves metabolism and gut microbiome composition in db/db mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2020 Jan 14. doi: 10.1038/s41401-019-0330-9. Epub ahead of print. PMID: 31937933.
- ZHAO, R.H.; ZHENG, P.Y.; LIU, S.M.; TANG, Y.C.; LI, E.Y.; SUN, Z.Y.; JIANG, M.M. [Correlation between gut microbiota and behavior symptoms in children with autism spectrum disorder]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2019 Jul;21(7):663-669. Chinese. PMID: 31315765.
- ZHOU, L.; XIAO, X.; ZHANG, Q.; ZHENG, J.; LI, M.; YU, M.; WANG, X.; DENG, M.; ZHAI, X.; LI, R. Improved Glucose and Lipid Metabolism in the Early Life of Female Offspring by Maternal Dietary Genistein Is Associated With Alterations in the Gut Microbiota. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Sep 4; 9:516. doi: 10.3389/fendo.2018.00516. PMID: 30233500; PMCID: PMC6131301.
- ZHOU, X.; WANG, Y.; HE, D.; ZENG, W.; ZHANG, C.; XUE, Z.; XING, X. [Interaction between orally administrated heparin and intestinal microbiota in mice]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2019 Sep 25;35(9):1736-1749. Chinese. doi: 10.13345/j.cjb.190148. PMID: 31559755.