RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 18/02/2025.

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Otimização da Seleção de Cepas Potencialmente Probióticas para Terapia Personalizada

Eliane Vale da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós de Graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

Área de Concentração: Ciências dos Alimentos.
Orientadora: Prof. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

Araraquara
2021

Otimização da Seleção de Cepas Potencialmente Probióticas para Terapia Personalizada

ELIANE VALE DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós de Graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Alimentos.
Orientadora: Prof. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

Araraquara
2021

Silva, Eliane Vale da.
S586o Otimização da Seleção de Cepas Potencialmente Probióticas para Terapia Personalizada / Eliane Vale da Silva. – Araraquara: [S.n.], 2020.
93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

1. Probiótico. 2. Personalizado. 3. Microbiota. 4. Crianças. 5. Banco de células. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada

AUTORA: ELIANE VALE DA SILVA
ORIENTADORA: DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI (Participaçao Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP

Profa. Dra. MARIANE PALUDETTI ZUBIETA (Participaçao Virtual)
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA (Participaçao Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP

Araraquara, 18 de fevereiro de 2021

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil.”.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2019/13942), pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Univ Estadual Paulista.

A todo o Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp - Câmpus de Araraquara pelas possibilidades e orientações.

A Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, pela paciência e orientação durante todo o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A Profa. Dra. Mariane Paludetti Zubieta pelo auxílio e orientação durante uma parte deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Biomoleculares da Unesp Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara.

A técnica Mariana Marchi Santoni Biasioli do Laboratório de Análises Biomoleculares da Unesp Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara, por toda orientação e paciência durante as análises.

Agradecimentos Pessoais

Primeiramente agradeço a Deus, pela direção, pela força e coragem durante esta caminhada sem ele tenho certeza que nada disso seria possível.

Agradeço a minha família em especial minha mãe, minha irmã Ana Paula e meu marido Rafael, por todo apoio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte deste processo de trabalho e aprendizado.

Agradeço a todos meus companheiros de laboratório Giovana, Maria Jara, Izabela, Vírginia e Mariela pelo companheirismo e que direta e indiretamente me auxiliaram de alguma forma.

Agradeço aos meus amigos que me acompanharam nessa jornada e tornaram os dias mais leves Abra Eli, Mateus, Isabela e Aline.

Agradeço aos técnicos do laboratório de Probióticos Josiane, Adriano e Roseli, pelos cafezinhos da tarde, auxílio e orientação durante o tempo passados juntos.

Agradeço aos pais e seus filhos por aceitarem participar desse trabalho e torná-lo possível.

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.

Josué 1:9

RESUMO

Introdução: A ingestão de probióticos, prebióticos, o transplante de microbiota fecal e o transplante de consórcio bacteriano são as principais estratégias utilizadas para modular a microbiota intestinal (MI) humana e prevenir ou tratar diferentes doenças intestinais. Entretanto, os efeitos de tais tratamentos são inconsistentes, provavelmente devido à resiliência desse complexo ecossistema e às características genéticas do hospedeiro. **Objetivo**: Otimizar a seleção e caracterização de cepas potencialmente probióticas, a partir de amostras fecais de crianças saudáveis e a construção de um "banco de microbiota" individualizado para terapia personalizada. **Metodologia:** As cepas bacterianas comensais foram isoladas das fezes de crianças (n=5), com idades entre dois e seis anos, por plaqueamento em meios seletivos. Posteriormente, foi realizada a caracterização das cepas isoladas pela técnica de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD-PCR), coloração de Gram, teste de catalase, sequenciamento do gene 16S rRNA, teste de resistência a condições gastrointestinais simuladas e suscetibilidade a antibióticos. **Resultados:** Foram isoladas cepas pertencentes aos gêneros *Enterococcus* 45% (*E. faecium, E. faecalis, E. avium, E. Hirae* e *E. galinarrium*), *Lactobacillus* 31,7 % (*L. paracasei* e *L. rhamnosus*), *Leuconostoc* 12,7% (*L. lactis*), *Weissella* 7,9% (*W.confusa*) e *Streptococcus* 3,2 % (*S. salivarius*). Todas as cepas se mostraram altamente resistentes às condições gastrointestinais simuladas, com redução máxima de 1,4 $\log_{10}$ UFC / mL e população final entre 9 e 8 $\log_{10}$ UFC / mL e foram sensíveis a pelo menos três antibióticos (ampicilina, cloranfenicol e ciprofloxacina). Após identificar e garantir o atendimento aos critérios mínimos para cepas potencialmente probióticas, as mesmas foram armazenadas em bancos individuais de células microbianas, por criopreservação a -80 °C. **Conclusão:** A criação de bancos de células microbianas potencialmente probióticas individualizados, a partir de amostras de fezes humanas, se mostrou viável para a população estudada e representa uma opção promissora para o tratamento personalizado de doenças relacionadas à disbiose.

Palavras-chave: probiótico, personalizado, microbiota, crianças, banco de células.

Abstract

Background: The intake of probiotics, prebiotics, fecal microbiota transplantation and bacterial consortium transplantation are the main strategies used to modulate the human intestinal microbiota (IM) and prevent or treat different intestinal diseases. However, the effects of such treatments are inconsistent, probably due to the resilience of this complex ecosystem and the host's genetic characteristics. **Objective:** To optimize the selection and characterization of potentially probiotic strains, from fecal samples from healthy children and the construction of an individualized bacterial cell bank for personalized therapy. **Methodology:** Commensal bacterial strains were isolated from the feces of children (n = 5), aged between two and six years, by plating in selective media. Subsequently, isolated strains were characterized by random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR), Gram stain, catalase test,16S rRNA gene sequencing, resistance to simulated gastrointestinal conditions and susceptibility to antibiotics. **Results:** It was isolate potentially probiotic strains of the genera *Enterococcus* 45% (*E. faecium, E. faecalis, E. avium, E. hirae, E. galinarrium*), *Lactobacillus* 31.7% *(L. paracasei* and *L. rhamnosus*) , *Leuconostoc* 12.7% (*L. lactis*), *Weissella* 7.9% (*W.confusa*) and *Streptococcus* 3.2% (*S. salivarius*). All strains proved to be highly resistant to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions, with a maximum reduction of 1.4 $\log_{10}$ CFU / mL and final population between 9 and 8 $\log_{10}$ CFU / mL and were sensitive to at least three antibiotics (ampicillin, chloramphenicol and ciprofloxacin). After identifying and ensuring compliance with the minimum criteria for potentially probiotic strains, they were stored in individual microbial cell banks by cryopreservation at -80 ° C. **Conclusion**: The creation of potentially individualized probiotic microbial cell banks, based on human feces samples, proved to be viable for the population studied and represents a promising option for the personalized treatment of diseases related to dysbiosis.

Keywords: probiotic, personalized, microbiota, children, cell bank

Lista de Tabelas

Tabela1. Caracterização dos Participantes.....44

Tabela 2. Resumos da seleção inicial das cepas potencialmente probióticas...54

Tabela 3. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas indivíduo 1.....59

Tabela 4. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas indivíduo 2.....60

Tabela 5. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas indivíduo 3.....61

Tabela 6. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas indivíduo 4.....62

Tabela 7. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas indivíduo 5.....63

Lista de Figuras

Figure 1. Otimização dos *primers* para RAPD-PCR.....50
Figure 2. Otimização $MgCl_2$ para RAPD-PCR.....50
Figure 3. Reações de RAPD-PCR otimizadas.....51
Figure 4. Reações de RAPD-PCR de cepas isoladas da MI.....53
Figura 5. Reações de RAPD-PCR de cepas isoladas da MI.....53

Lista de Apêndices

Apêndice 1. Termo de aprovação do comitê de ética.....77
Apêndice 2. Termo de Assentimento livre e esclarecido 79
Apêndice3. Termo de consentimento livre e esclarecido 81
Apêndice 4. Termo de doação de material biológico.....83
Apêndice 5. Imagens RAPD-PCR Indivíduo 1 84
Apêndice 6. Imagens RAPD-PCR Indivíduo 2 86
Apêndice 7. Imagens RAPD-PCR Indivíduo 3.....88
Apêndice 8. Imagens RAPD-PCR Indivíduo 4.....90
Apêndice 9. Imagens RAPD-PCR Indivíduo 5.....92

SUMÁRIO

Introdução **14**
Referências **28**
Capitulo 1 ..... **39**
Resumo **40**
Introdução **41**
Materiais e metódos **43**
Resultados e discussão **49**
Conclussão **65**
Considerações finais **66**
Referências **67**

Introdução

O corpo humano abriga uma enorme, complexa e dinâmica comunidade de microrganismos, que reúne mais de 100 trilhões de microrganismos, sendo que a maior parte se encontra no trato gastrointestinal (TGI) inferior, especificamente no colón [1]. Esse ecossistema microbiano é conhecido como “microbiota intestinal” (MI), que consiste em uma comunidade de microrganismos comensais e patogênicos que, junto com cerca de 3 milhões de genes (microbioma), atuam de forma simbiótica com o hospedeiro [2].

A MI é regulada e estabilizada por uma complexa rede de interações que envolve um “*crosstalk”* entre as vias metabólica, imune e neuroendócrina, e que é mediada por metabólitos sintetizados pelos próprios microrganismos [3]. Essa comunidade atua principalmente, na modulação da defesa imunológica [4, 5], função cerebral [6] e regulação do metabolismo do hospedeiro [7, 8].

Estudo realizado por Savage (1977) demonstrou que a quantidade de células microbianas presente no TGI chega a ser dez vezes (10:1) superior ao número de células do corpo humano, quando são consideradas apenas as células nucleadas. Já em estudo realizado por Sender et al. (2016) foi evidenciado que a proporção entre células humanas e microbianas é praticamente igual (1:1.3), quando se leva em consideração também a contagem de células enucleadas (hemácias).

Essa enorme comunidade é composta por bactérias, vírus, fungos, parasitas e *Archaea* [9, 10]. Em um adulto saudável a MI é constituída, principalmente, pelos filos *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria* e *Actinobacteria*, com predomínio de *Bacteroidetes* e *Firmicutes,* que juntos representam mais de 90% do total da comunidade microbiana [11, 12]. Estudo conduzido por Arumugam et al. (2011) concluiu que a MI humana pode ser agrupada em três “enterótipos” de acordo com a abundância de *Bacteroides* spp. (*enterotype* 1), *Prevotella* spp. (*enterotype* 2) e *Ruminococcus* spp. (*enterotype* 3). Apesar dessa aparente similaridade, a MI de cada indivíduo apresenta um perfil particular e único, que varia taxonômica e funcionalmente em cada parte

do TGI e sofre variações relacionadas à idade, uso de antibióticos, fatores ambientais e hábitos de vida (alimentação, tabagismo e prática de exercícios) [14].

Ao longo do TGI ocorre uma variação quantitativa das comunidades bacterianas. O estômago e o intestino delgado apresentam menor colonização de bactérias (10^3 a 10^4 bactérias / mL) quando comparado ao cólon (10^{14} bactérias/mL). Isso ocorre devido ao pH ácido, presença de secreções biliares e pancreáticas, atividade peristáltica, baixos níveis de oxigênio e presença de antimicrobianos no estomago e no intestino delgado. Mesmo nessas condições, uma comunidade microbiana, dominada por anaeróbios facultativos que independente da presença ou não de oxigênio, conseguem se estabelecer devido à alta tolerância às condições adversas encontradas nesses locais [15, 16].

No estômago, duodeno e jejuno se encontram principalmente bactérias dos gêneros *Estreptococos* spp*., Staphylococcus* spp*., Enterococcus* spp*, Lactobacillus* spp. e *Corinebacterium* spp. Enquanto no íleo e no colón são predominantes: *Escherichia* spp*.*, *Klebsiella* spp*., Enterobacter* spp*., Bacteróides* spp*., Eubacterium* spp*., Clostridium* spp*., Ruminococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. [17].

O estabelecimento da MI é um processo complexo, influenciado por diversas interações recíprocas entre a microbiota, o hospedeiro e as condições ambientais à que o mesmo é exposto. A MI do adulto mantém-se mais estável ao longo do tempo, apresentando uma maior diversidade de microrganismos, contrastando com a MI de recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida (zero à três anos de idade), que passam por uma colonização rápida e possuem menor diversidade e estabilidade [18].

Alguns estudos sugerem que a colonização do TGI começa antes do nascimento, através do contato do feto com o líquido amniótico e o cordão umbilical [19, 20]. Entretanto, a hipótese mais aceita é que a colonização ocorra após o nascimento, sendo adquirida a partir do contato do bebê com o meio externo, incluindo a microbiota vaginal, fecal e pele da mãe e de profissionais da

saúde envolvidos no parto. O tipo de parto (normal e cesáreo) também influência a colonização inicial da microbiota, composta principalmente por bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas dos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., seguida de anaeróbios obrigatórios dos gêneros *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp. [21–23].

No primeiro ano de vida o TGI da criança vai de estéril para colonização extremamente densa, com a população composta principalmente por microrganismos dos filos *Actinobacteria* e *Bacteroidetes.* Ao completar dois ou três anos de idade essa microbiota adquire certa estabilidade, assemelhando-se à encontrada no intestino de um indivíduo adulto [24]. Entretanto, alguns episódios de diarreia, tratamento com antibióticos ou intervenções dietéticas podem causar alterações em sua composição [25].

A MI é responsável pela fermentação de carboidratos complexos, não digeríveis pelo hospedeiro, que resulta na formação de gases e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente acetato, propionato e butirato - metabólitos importantes na gênese de diferentes doenças. A fermentação desses carboidratos melhora a absorção de íons no ceco, estimula a produção de muco e a função de barreira intestinal. Os AGCCs podem se ligar aos receptores acoplado à proteína G (GPCR-41 e GPCR-43), relacionados à indução da secreção de peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e peptídeo YY (PYY) que contribuem para redução do apetite, aumento do gasto energético, e melhora do metabolismo da glicose e secreção de insulina [25-27]. O butirato é quase todo consumido pelo epitélio do colón se tornando uma importante fonte de energia para os colonócitos, atuam como proteínas receptoras nucleares ativadas por proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPARγ), estimulador da β-oxidação (processo catabólico de ácidos graxos que consiste na sua oxidação mitocondrial) e consumo de oxigênio, mantendo um ambiente anaeróbio no lúmen intestinal [28–30]. Além disso, a MI também está envolvida na proteólise, síntese de vitaminas, absorção de cálcio, magnésio e ferro [31–34].

Outra importante função da MI e seus metabólitos está associada à sua íntima relação com o sistema imunológico da mucosa intestinal. AGCCs foram relacionados à restauração ou aumento de células T reguladoras (Tregs), que expressam o fator de transcrição Foxp3 e são responsáveis pela manutenção da homeostase do sistema imunológico e limitam a inflação intestinal da colite induzida experimentalmente [35]. Os metabólitos derivados da microbiota também atuam na modulação da resposta imune pela ativação do inflamassoma e produção de interleucinas e de peptídeos antimicrobianos. Muitas doenças crônicas são associadas a uma alteração na regulação das respostas inflamatórias, com participação da MI e seus metabólitos, já que o intestino é considerado o maior órgão imunológico do corpo humano [36].

Ao longo dos anos, diferentes estudos vêm elucidando o papel fundamental da MI na saúde do ser humano e como as alterações qualitativas (perdas de diversidade microbiana) e quantitativas afetam diretamente o metabolismo e a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para a patogênese de diferentes doenças inflamatórias, autoimunes e comportamentais, incluindo obesidade, diabetes, doenças inflamatórias intestinais, asma e distúrbios do sistema nervoso central [37–39].

Apesar de ser difícil estabelecer uma relação entre perfil de microbiota e doenças específicas, alguns estudos conseguiram respostas robustas. Pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais frequentemente apresentam redução na biodiversidade da MI [40], com diminuição de bactérias do filo *Firmicutes* (particularmente da classe *Clostridia*) e aumento das pertencentes ao filo *Proteobacteria*, que inclui vários gêneros patogênicos (*Escherichia* spp., *Campylobacter* spp., *Heliobacter* spp.) [41]. Por outro lado, a microbiota de indivíduos obesos exibe maior proporção de microrganismos do filo *Firmicutes* e menor de *Bacteroidete*s [42, 43].

O uso de antibióticos de amplo espectro que, além de controlar os microrganismos patogênicos podem suprimir microrganismos benéficos, é a causa mais conhecida envolvida no desequilíbrio da MI, também conhecido como disbiose intestinal [44–46]. Alguns antimicrobianos, como a rifaximina, têm

sido utilizados para o controle de sintomas característicos de doenças gastrintestinais e modulação da microbiota [47]. Entretanto, como já mencionado, a antibioticoterapia pode ser causa de disbiose intestinal, além de existir a possibilidade de seleção de patógenos resistentes ao antibiótico utilizado [48, 49].Dietas inadequadas e fatores psicológicos, também são associados à modificação na composição da MI e à maior susceptibilidade a doenças intestinais e extra-intestinais [50, 51].

Diante da importância da disbiose na gênese de diferentes doenças e o seu impacto na saúde, houve um crescente interesse na modulação desse ecossistema. Algumas abordagens têm sido utilizadas com esse propósito, merecendo destaque a administração de antibióticos, probióticos e prebióticos, transplante de microbiota fecal e, recentemente, as terapias personalizadas [52, 53].

O transplante de microbiota fecal (TMF) envolve a administração de comunidades microbianas minimamente manipuladas das fezes de um doador saudável para um paciente com microbiota degenerada, através do uso de sonda ou via oral em capsula. Essa abordagem vem sendo aplicada com sucesso em pacientes que apresentam infecções intestinais recorrentes por *Clostridium difficile.* Uma revisão de 317 casos de doenças intestinais recorrentes, causadas particularmente por esse patógeno, concluiu que o TMF levou a resolução de 92% dos casos [54]. Porém as preocupações com a possibilidade de transmissão de infecções ocultas do doador, aceitação do paciente, transferência potencial de uma microbiota que predispõe o receptor a obesidade, doença inflamatória intestinal ou síndrome metabólica, ainda limitam a utilização dessa técnica [55]. O transplante de consórcio bacteriano, que consiste na utilização de cepas isoladas das fezes de um doador saudável para o tratamento de doenças em um paciente receptor, pode ser considerado uma evolução do TMF e aumenta a segurança da terapia [56].

Entre as principais estratégias utilizadas para modular a composição da MI está a administração de microrganismos probióticos, que podem ser veiculados em alimentos ou em formas farmacêuticas. De acordo com a *Food*

and Agriculture Organization (FAO) e *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics,* probióticos é definido como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” [57, 58]. Os microrganismos probióticos mais estudados e utilizados em alimentos funcionais e suplementos alimentares incluem: *Bifidobacterium* spp. das espécies *B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve* e *B. longum* e *Lactobacillus* spp. das espécies *L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. gasseri, L. johnsonii, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus* e *L. salivarius* [59, 60].

Após estudos realizados com diferentes doenças que ocorrem no TGI (diarreia infecciosa, diarreia associada a antibióticos, colite ulcerativa e enterocolite necrosante), ficou claro que a maioria dos microrganismos probióticos compartilham dos mesmos mecanismos de ação, atuando no estabelecimento de um sistema digestivo e imunológico saudável [61–64]. Os principais mecanismos de ação dos probióticos incluem: aumento de microrganismos benéficos na MI; aderência competitiva à mucosa e epitélio; fortalecimento da barreira epitelial intestinal; produção de metabólitos, com destaque para os AGCC e modulação do sistema imunológico [64, 65].

No entanto, não se pode generalizar os potenciais benefícios desses microrganismos, pois os efeitos dos probióticos tendem a ser específicos para cada cepa. Estudos com microrganismos probióticos específicos vêm elucidando os efeitos benéficos e seus diferentes mecanismos de ação*: L. plantarum* tem sido apontado como indutor de produção de mucinas (MUC2 e MUC3) que são glicoproteínas complexas sintetizadas e secretadas por células epiteliais, incluindo as células epiteliais da mucosa do trato intestinal que inibem aderência de patógenos como *Escherichia coli* enteropatogênica; *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. foram capazes de inibir o crescimento de uma ampla gama de patógenos, incluindo *E. coli* , *Salmonella s*pp., *Helicobacter pylori, Listeria monocytogenes,* e rotavirus, através da produção de substâncias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos lático e acético [64, 66–72].

Apesar dos efeitos benéficos comprovados dos probioticos na prevenção e tratamento de doenças intestinais (diarreia infecciosa, diarreia associada a antibióticos, colite ulcerativa, doença celíaca e enterocolite necrosante) [61–64] e extra-intestinais (diabetes tipo 1, artrite rematóide) [73, 74], os resutados dessa abordagem são, muitas vezes, inconsistentes, tanto em modelos animais, quanto em estudos clínicos. A dose, a via de administração e a formulação da preparação probiótica podem afetar a sua eficácia, o que explicaria em parte os resultados divergentes encontrados [75, 76]. Outro fator relevante, e que vem sendo estudado mais profundamente, é o impacto da variabilidade genética do hospedeiro na composição e função da MI, que influencia aspectos fisiológicos e na forma como o organismo responde a alguns tratamentos.

Assim diante das limitações do TMF, das inconsistências dos resultados com probióticos e da especificidade da microbiota, houve a necessidade de abordagens inovadoras, surgindo com isso um novo conceito de medicina “personalizada” ou “de precisão” aplicada à microbiota, que atende as caracteristicas especificas do hospedeiro.Essa terapia personalizada foi definida dentro da medicina por Larry e Longo (2015) como “um tratamento voltado para as necessidades de pacientes individuais, com base em biomarcadores, características genéticas, fenotípicas ou psicossociais, que distinguem um dado paciente de outros pacientes com apresentações clínicas semelhantes”.

Suwal et al. (2018) avaliaram os fatores que interferem na eficácia dos probióticos na prevenção da colite e os resultados evidenciaram que a composição específica da MI, junto com fatores genéticos de cada hospedeiro, pode ser determinante no efeito observado. Acredita-se ainda, que a microbiota já estabelecida de cada indivíduo dificulte a incorporação de cepas microbianas que não fazem parte daquele ambiente, como as cepas probióticas convencionais, interferindo no efeito esperado. Portanto, o tratamento de um paciente que sofre de uma infecção intestinal recorrente poderia ser mais eficaz com a utilização de uma ou mais espécies de microrganismos benéficos, isolados do próprio paciente [78].

Em um estudo realizado Chong et al. (2020), sobre a composição MI de indivíduos que passaram por transplante de órgãos e de células-tronco

hematopoiéticas, foi relatado que o uso de antibióticos e de regimes preparatórios antes do transplante podem esgotar as bactérias comensais do intestino, resultando em disbiose intestinal. O tratamento personalizado, com cepas isoladas do próprio indivíduo antes de serem transplantados, foi citado como uma boa opção para repor a MI, pois respeitaria a especificidade e minimizaria o efeito do fenômeno de resiliência da microbiota, que dificulta a incorporação de novos microrganismos à comunidade de microrganismos nativa [80].

Apesar de ser um conceito muito aceito pela comunidade científica, poucos estudos avaliaram a eficácia da terapia personalizada com probióticos em tratamentos de doenças intestinais ou extra intestinais. A maioria dos estudos que utilizou essa abordagem selecionou cepas capazes de produzir determinados metabólitos [81] ou que auxiliam no desempenho de um grupo específico de indivíduos [82].

Assim, o grupo do Laboratório de Pesquisa em Probióticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-Unesp, Araraquara/SP) popôs uma nova abordagem de terapia personalizada com microrganismos potencialmente probióticos isolados do próprio indivíduo, para prevenção e tratamento de doenças relacionadas à disbiose. Essa abordagem consiste no isolamento de cepas potencialmente probióticas das fezes de um indivíduo saudável, preferencialmente na infância e logo após a estabilização da microbiota (entre dois e três anos de idade), para garantir a seleção de uma gama maior de cepas e evitar a influência de doenças que venham a se desenvolver durante a vida. Essas cepas são identificadas, caracterizadas e armazenadas em um “banco de microbiota”. Caso o paciente doador manifeste alguma doença cuja gênese envolva a disbiose, essas cepas seriam utilizadas para a restauração da microbiota indígena.

A seleção e a criação de um banco de microrganismos da MI para a terapia personalizada envolve métodos de cultivo convencional, técnicas moleculares e técnicas de conservação de microrganismos, garantido assim cepas puras, identificadas e que sobrevivam ao longo dos anos.

Diversas são as técnicas moleculares utilizadas em estudos sobre diversidade genética microbiológica, entre elas está a RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic* DNA) uma técnica rápida, econômica e que não exige conhecimento prévio do genoma sob investigação. Essa técnica utiliza *primers* randômicos curtos (10-25 bases) e arbitrários, capazes de anelar em múltiplos locais do genoma a baixas temperaturas, amplificando fragmentos de tamanhos variados e característicos do DNA molde, que servem para discriminar indivíduos ou espécies. A RAPD-PCR é uma reação enzimática e as concentrações dos componentes (*primers*, MgCl2, dNTPs, DNA e enzima Taq), as condições da reação e a qualidade do DNA interferem diretamente nos resultados e, por isso, os protocolos de análise precisam ser cuidadosamente desenvolvidos para serem reproduzíveis [83]. Esse método possibilita a detecção das variações genéticas presentes nos isolados, relacionadas a eventos moleculares como mutações pontuais, rearranjos genômicos e cromossômicos, deleção e inserções (64), com geração de diferentes padrões de bandas (65).

Para que as cepas selecionadas da MI de cada indivíduo possam ser utilizadas futuramente, caso o indivíduo desenvolva doença relacionada à disbiose ou passe por procedimento que altere a composição da sua microbiota, é necessário utilizar técnicas adequadas de preservação e de criação de biobancos.

Até o presente momento, a criopreservação é o melhor e mais usado método de preservação disponível, que possibilita a longo prazo um armazenamento estável de microrganismos e permite adaptações para adequar o protocolo a cada tipo de célula [84]. A criopreservação é a preservação de materiais biológicos em temperaturas criogênicas, geralmente entre -80°C ou -196°C, temperaturas essas consideradas ideais para a preservação das células, pois as chances de mutações no DNA são quase nulas. Essas baixas temperaturas evitam a desnaturação das proteínas e do DNA, retardam o movimento da água, evitando danos celulares e interrompem as atividades bioquímicas e fisiológicas das células, garantindo proteção por longos períodos de tempo [85]. A composição do meio de criopreservação, a natureza dos crioprotetores, o procedimento de congelamento e descongelamento e a

suscetibilidade das células ao dano por congelamento são alguns fatores essenciais para uma preservação bem-sucedida [84].

Os métodos de congelamento mais utilizados são os mecânicos, que envolvem um ciclo de refrigeração normal, e o criogênico, por contato com nitrogênio líquido. O método criogênico, apesar de mais caro, permite um congelamento rápido, que ocasiona menos danos e possibilita a conservação dos microrganismos com segurança por muitos anos e com pouca manutenção [84].

No entanto, todo congelamento pode ocasionar crioinjúria nas células, que são danos causados por concentração, mudanças de pH, precipitação de tampões, gases dissolvidos, concentração de eletrólitos, cristalização intracelular resultante da perda de água de hidratação de macromoléculas e encolhimento celular [86, 87]. No intuito de reduzir esses danos, as abordagens tradicionais para criopreservação envolvem o resfriamento controlado à taxa de -1 °C por minuto, com uso de crioprotetores, sendo os mais utilizados glicerol, trehalose ou dimetilsulfóxido (DMSO) [88].

A escolha do agente crioprotetor depende do tipo de célula a ser preservado. Para a maioria das células, o glicerol é o agente de escolha porque geralmente é menos tóxico que o DMSO. No entanto, DMSO é mais penetrante e geralmente é o agente usado para células complexas, como protistas. Recomenda-se que o agente crioprotetor seja diluído para a concentração desejada em meio de crescimento fresco, antes de adicioná-lo à suspensão de células. Isso minimiza os potenciais efeitos deletérios das reações químicas e garante uma exposição uniforme ao agente crioprotetor, reduzindo potenciais efeitos tóxicos [87, 89]. DMSO e glicerol são geralmente usados em concentrações que variam de 10 - 15% (v / v), dependendo do tipo de célula preservada [89].

Outro fator importante para preservação de microrganismos a longo prazo é o descongelamento das células, que deve ser rápido e controlado, utilizando banho-maria a 37 °C [89].

Diferentes estudos estão sendo realizados na tentativa de criação de um protocolo de criopreservação universal e padronizado, levando em consideração

os objetivos, a variedade de características morfológicas e fisiológicas dos microrganismos da MI e incluindo os critérios para avaliação da eficácia da criopreservação [89–91]. No entanto, até o momento não existe consenso sobre o melhor protocolo para preservar os microrganismos selecionados da MI a longo prazo, e que seja capaz de contemplar as especificidades de cada cepa.

A Federação Mundial de Coleções de Cultura *(World Federation for Culture Collections* - WFCCs) produziu um guia que estabelece critérios para a operação de coleções de cultura, e entre os principais objetivos está o uso de técnicas de preservação a longo prazo. A WFCCs reconhece que diferentes microrganismos geralmente demandam de métodos de preservação especiais para garantir a viabilidade, armazenamento e pureza ideal. A entidade estabelece que, por segurança e a fim de minimizar a probabilidade de perda, cada cepa deve, sempre que possível, ser mantida por pelo menos dois procedimentos diferentes, onde pelo menos um deles seja por liofilização ou armazenamento em temperatura ultrabaixa em nitrogênio líquido ou freezers mecânicos. Na impossibilidade de utilizar dois métodos distintos, os estoques criopreservados devem ser mantidos em locais separados e deve ser estabelecidos bancos de células mestras, a partir dos quais podem ser obtidos estoques adicionais para distribuição [92].

A gestão da qualidade e segurança dos bancos de criopreservação foi abordada inicialmente pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OCDE), juntamente com *Biological Resource Centres* (BRCs), com intuito de estabelecer um padrão de qualidade comum, mas que fosse baseado em uma extensão da orientação já existente que havia sido estabelecida anteriormente para coleções de culturas de células e microrganismos, usando as seguintes orientações:

- Diretrizes da WFCC para o estabelecimento e operação de coleções de microrganismos (http://www.wfcc.info/guidelines/).
- Sistema de gestão de qualidade UKNCC (http://www.ukncc.co.uk/)
- Diretrizes de Recursos e Informações Biológicas (CABRI) (http://www.cabri.org/).

Essas orientações trazem as diretrizes gerais para todas os BRCs em práticas organizacionais, de biossegurança e para domínio de microrganismos, que incluí a execução de testes de autenticação e estabelece informações básicas para verificações da manutenção durante o armazenamento. Para garantir que as culturas não tenham sofrido alterações fisiológicas ou genéticas após a criopreservação, devem ser realizadas avaliações da taxa de crescimento e morfologia da cultura, incluindo a análise do metabolismo ou uma avaliação em nível molecular, garantindo assim que as cepas sejam puras e sobrevivam a longo do tempo [84, 93].

Quando se pensa na terapia personalizada e na necessidade de armazenamento das cepas a longo prazo, todos os aspectos de criopreservação devem ser considerados, para garantir a sobrevivência e segurança das mesmas.

O primeiro estudo utilizando a terapia personalizada proposta por nosso grupo de pesquisa, com microrganismos isolados da microbiota antes da instalação da doença, foi conduzido por Celiberto et al. (2018). Nesse estudo foi feito o isolamento de cepas bacterianas (*Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.) das fezes de camundongos saudáveis e, em seguida, administradas de volta ao hospedeiro como um tratamento personalizado para colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS). O grupo que recebeu o probiótico personalizado mostrou susceptibilidade reduzida à colite em comparação com o grupo que recebeu o probiótico comercial. Essa melhora foi caracterizada por um menor índice de atividade da doença e menor dano histopatológico no cólon. Além disso, o probiótico personalizado foi mais efetivo na modulação da resposta imune do hospedeiro, levando à redução de IL-1β e IL-6 (citocinas pró-inflamatórias) e aumento de TGF-β e IL-10 (citocinas anti-flamatórias). Os resultados indicam que os probióticos personalizados possuem uma vantagem sobre os probióticos comerciais no tratamento de condições relacionadas com a disbiose, possivelmente porque foram isolados da própria microbiota do hospedeiro. Em outras palavras, nenhum novo microrganismo foi introduzido e a população original foi somente restabelecida.

A presente proposta se assemelha somente a dois estudos conduzidos por Kort et.al. (2014) e Nakatsuji et al. (2017). O primerio propôs a coleta de material biológico de indivíduo portador de uma doença e o cultivo dessa amostra em condições que estimulariam a multiplicação de bactérias probióticas, que poderiam ser utilizadas para elaborar medicamentos para o tratamento de doenças, como vaginose bacteriana. Entretanto, trata-se apenas de uma proposta, sem resultado *in vivo* publicado. No segundo estudo, cepas de *Sthaphylococcus hominis* ou *Sthaphylococcus epidermidis* produtoras de substâncias antimicrobianas contra *S. aureus* foram isoladas da pele de indivíduos saudáveis e portadores de dermatite atópica e utilizadas para formular um creme para tratamento da dermatite. O diferencial do trabalho conduzido por nosso grupo de pesquisa é o fato de propormos a coleta de microrganismos e o estabelecimento do "banco de microbiota" antes do desenvolvimento da doença, garantindo a restauração da microbiota comensal saudável do paciente.

No estudo realizado por Celiberto et al. (2018) foi possível selecionar duas cepas de *Bifidobacterium* spp. e uma de *Lactobacillus* spp. diferentes, provavelmente pelo fato de terem sido utilizados animais isogênicos e *Specific Pathogen Free*. Acredita-se que o ideal seria o isolamento de um maior número de espécies desses gêneros, para garantir a restauração da MI. Nesse sentido, acreditamos que o próximo passo para testar essa abordagem é a realização do isolamento de uma maior quantidade de cepas diferentes de voluntários saudavéis, na faixa etária entre três e seis anos, período em que a microbiota intestinal atingiu a estabilidade.

Frente ao exposto, este trabalho tem como objetivo geral a otimização e construção de um banco de células microbianas, constituido de cepas potencialmente probióticas isoladas da microbiota fecal humana, para utilização em terapia personalizada. Os objetivos específicos incluem a otimização da técnica de RAPD com as cepas isoladas da microbiota de cada indivíduo; isolamento e caracterização de cepas potencialmente probióticas das fezes de indivíduos na faixa etária entre três e seis anos de idade; idenficação a nível especíe de cada cepa selecionada da microbiota fecal dos indivíduos por

técnicas moleculares (sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S) e elaboração de um “banco de microbiota” para cada indivíduo, avaliando a viabilidade da proposta apresentada.

Considerações finais

Foi possível isolar cepas potencialmente probióticas e criar bancos de células microbianas representativas da MI de cada indivíduo, armazenando as células por criopreservação para uso na terapia personalizada.

O diferencial dessa nova abordagem é a possibilidade de reverter a disbiose intestinal com bactérias da MI do próprio paciente, isoladas nos primeiros anos de vida e respeitando as características de cada indivíduo.

As técnicas aqui apresentadas, tanto de cultivo como moleculares, foram adequadas para a criação dos bancos de microbiota personalizados. Porém, metodologias para seleção de outros gêneros importantes, como *Bifidobacterium* spp., continuarão a ser testados para garantir maior diversidade na composição do “banco de microbiota”.

Essa estratégia pode auxiliar na redução dos resultados inconsistentes associados ao uso de probióticos comerciais e dos potenciais riscos do TMF, já que as cepas pertencem à microbiota indígena do paciente e são previamente selecionadas e caracterizadas.

A proposta da terapia totalmente personalizada com probióticos apresentada nesse estudo pode ser considerada segura, pois foram isoladas cepas de bactérias láticas que já viviam em harmonia na microbiota de cada paciente e todas possuem sensibilidade a pelo menos três antibióticos utilizados em terapia antimicrobiana.

A principal limitação do estudo refere-se à impossibilidade de determinar a concentração ideal de cada cepa necessária para restauração da microbiota e obtenção dos efeitos benéficos.

Os resultados obtidos com essa terapia são promissores, mas antes de serem aplicados em humanos, devem ser testados em outros modelos animais e doenças distintas, para confirmação dos efeitos benéficos.

Referências:

[1] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol* 2016; 14: e1002533.

[2] Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7010014.

[3] Kho ZY, Lal SK. The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease. *Front Microbiol* 2018; 9: 1835.

[4] Amoroso C, Perillo F, Strati F, et al. The Role of Gut Microbiota Biomodulators on Mucosal Immunity and Intestinal Inflammation. *Cells* 2020; 9: 1234.

[5] Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 2014; 157: 121–141.

[6] Rogers GB, Keating DJ, Young RL, et al. From Gut Dysbiosis to Altered Brain Function and Mental Illness: Mechanisms and Pathways. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 738–748.

[7] Martin AM, Sun EW, Rogers GB, et al. The Influence of the Gut Microbiome on Host Metabolism Through the Regulation of Gut Hormone Release. *Front Physiol* 2019; 10: 428.

[8] Fabbiano S, Suárez-Zamorano N, Chevalier C, et al. Functional Gut Microbiota Remodeling Contributes to the Caloric Restriction-Induced Metabolic Improvements. *Cell Metab* 2018; 28: 907-921.e7.

[9] Savage DC. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31: 107–133.

[10] Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The Healthy Human Microbiome. *Genome Med* 2016; 8: 51.

[11] Forster SC, Kumar N, Anonye BO, et al. A Human Gut Bacterial Genome and Culture Collection for Improved Metagenomic Analyses. *Nat Biotechnol* 2019; 37: 186–192.

[12] Mailhe M, Ricaboni D, Vitton V, et al. Repertoire of the Gut Microbiota from Stomach to Colon Using Culturomics and Next-Generation Sequencing. *BMC Microbiol* 2018; 18: 157.

[13] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature* 2011; 473: 174–180.

[14] Valdes AM, Walter J, Segal E, et al. Role of the Gut Microbiota in Nutrition and Health. *BMJ*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1136/bmj.k2179.

[15] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol* 2016; 14: e1002533.

[16] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut Biogeography of the Bacterial Microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 20–32.

[17] Avelar Rodriguez D, Ryan PM, Toro Monjaraz EM, et al. Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Children: A State-Of-The-Art Review. *Front Pediatr* 2019; 7: 4–7.

[18] Thursby E, Juge N. Introduction to the Human Gut Microbiota. *Biochem J* 2017; 474: 1823–1836.

[19] Walker RW, Clemente JC, Peter I, et al. The Prenatal Gut Microbiome: are we Colonized with Bacteria in Utero ? *Pediatr Obes* 2017; 12: 3–17.

[20] Collado MC, Rautava S, Aakko J, et al. Human Gut Colonisation May be

Initiated in Utero by Distinct Microbial Communities in the Placenta and Amniotic Fluid. *Sci Rep* 2016; 6: 23129.

[21] Martin R, Makino H, Cetinyurek Yavuz A, et al. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One* 2016; 11: e0158498.

[22] Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017; 81: e00036-17.

[23] Bezirtzoglou E. The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe* 1997; 3: 173–177.

[24] Derrien M, Alvarez A-S, de Vos WM. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol* 2019; 27: 997–1010.

[25] Dudek-Wicher RK, Junka A, Bartoszewicz M. The Influence of Antibiotics and Dietary Components on Gut Microbiota. *Gastroenterol Rev* 2018; 13: 85–92.

[26] Flint A, Raben A, Rehfeld J, et al. The Effect of Glucagon-Like Peptide-1 on Energy Expenditure and Substrate Metabolism in Humans. *Int J Obes* 2000; 24: 288–298.

[27] Fan Y, Pedersen O. Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease. *Nat Rev Microbiol* 2021; 19: 55–71.

[28] Venter CS, Vorster HH, Cummings JH. Effects of Dietary Propionate on Carbohydrate and Lipid Metabolism in Healthy Volunteers. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 549–553.

[29] Abdul Rahim MBH, Chilloux J, Martinez-Gili L, et al. Diet-induced Metabolic Changes of the Human Gut Microbiome: Importance of Short-Chain Fatty Acids, Methylamines and Indoles. *Acta Diabetol* 2019; 56:

493–500.

[30] Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, et al. Microbiota-activated PPAR-γ Signaling Inhibits Dysbiotic Enterobacteriaceae Expansion. *Science (80-)* 2017; 357: 570–575.

[31] Guarner F, Malagelada J-R. Gut Flora in Health and Disease. *Lancet* 2003; 361: 512–519.

[32] Conly JM, Stein K, Worobetz L, et al. The Contribution of Vitamin K2 (Menaquinones) Produced by the Intestinal Microflora to Human Nutritional Requirements for Vitamin K. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 915–923.

[33] Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, et al. Short Chain Fatty Acids in Human Large Intestine, Portal, Hepatic and Venous Blood. *Gut* 1987; 28: 1221–1227.

[34] Rowland I, Gibson G, Heinken A, et al. Gut Microbiota Functions: Metabolism of Nutrients and Other Food Components. *Eur J Nutr* 2018; 57: 1–24.

[35] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science (80-)* 2013; 341: 569–573.

[36] Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* 2015; 163: 1428–1443.

[37] Balfour Sartor R, Muehlbauer M. Microbial Host Interactions in IBD: Implications for Pathogenesis and Therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 497–507.

[38] Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al. Gut Microbiota Regulate Motor

Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 2016; 167: 1469-1480.e12.

[39] Tremaroli V, Bäckhed F. Functional Interactions Between the Gut Microbiota and Host Metabolism. *Nature* 2012; 489: 242–249.

[40] Imhann F, Vich Vila A, Bonder MJ, et al. Interplay of Host and Gut Microbiota Underlying the Onset and Clinical Presentation of Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 2018; 67: 108–119.

[41] Mukhopadhya I, Hansen R, El-Omar EM, et al. IBD—What Role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 219–230.

[42] Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, et al. Association Between Body Mass Index and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in an Adult Ukrainian Population. *BMC Microbiol* 2017; 17: 120.

[43] Krajmalnik-Brown R, Ilhan Z-E, Kang D-W, et al. Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. *Nutr Clin Pract* 2012; 27: 201–214.

[44] Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete Recovery and Individualized Responses of the Human Distal Gut Microbiota to Repeated Antibiotic Perturbation. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 4554–4561.

[45] Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, et al. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol* 2008; 6: e280.

[46] Bhalodi AA, van Engelen TSR, Virk HS, et al. Impact of Antimicrobial Therapy on the Gut Microbiome. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: i6–i15.

[47] Basseri RJ, Weitsman S, Barlow GM, et al. Antibiotics for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology and Hepatology* 2011; 7:

455–93.

[48] Kothary V, Scherl EJ, Bosworth B, et al. Rifaximin Resistance in *Escherichia coli* Associated with Inflammatory Bowel Disease Correlates with Prior Rifaximin Use, Mutations in rpoB, and Activity of Phe-Arg- -Naphthylamide-Inhibitable Efflux Pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 811–817.

[49] Rizzatti G, Ianiro G, Gasbarrini A. Antibiotic and Modulation of Microbiota. *J Clin Gastroenterol* 2018; 52: S74–S77.

[50] Conlon M, Bird A. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients* 2014; 7: 17–44.

[51] Karl JP, Margolis LM, Madslien EH, et al. Changes in Intestinal Microbiota Composition and Metabolism Coincide with Increased Intestinal Permeability in Young Adults Under Prolonged Physiological Stress. *Am J Physiol Liver Physiol* 2017; 312: G559–G571.

[52] Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, et al. European Consensus Conference on Faecal Microbiota Transplantation in Clinical Practice. *Gut* 2017; 66: 569–580.

[53] Celiberto L, Pinto R, Rossi E, et al. Isolation and Characterization of Potentially Probiotic Bacterial Strains from Mice: Proof of Concept for Personalized Probiotics. *Nutrients* 2018; 10: 1684.

[54] Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic Review of Intestinal Microbiota Transplantation (Fecal Bacteriotherapy) for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 994–1002.

[55] Pamer EG. Fecal Microbiota Transplantation: Effectiveness, Complexities, and Lingering Concerns. *Mucosal Immunol* 2014; 7: 210–214.

[56] Li M, Liang P, Li Z, et al. Fecal Microbiota Transplantation and Bacterial Consortium Transplantation have Comparable Effects on the Re-establishment of Mucosal Barrier Function in Mice with Intestinal Dysbiosis. *Front Microbiol* 2015; 6: 692.

[57] Hill C, Guarner F, Reid G, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506–514.

[58] Hill C, Guarner F, Reid G, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506–514.

[59] Health Canada. Accepted Claims About the Nature of Probiotic Microorganisms in Food. *CFIA Guid to Food Label Advert*.

[60] Zielińska D, Kołożyn-Krajewska D. Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 1–15.

[61] Goldenberg JZ, Ma SSY, Saxton JD, et al. Probiotics for the Prevention of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in Adults and Children. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 2013: CD006095.

[62] Bernaola Aponte G, Bada Mancilla CA, Carreazo NY, et al. Probiotics for Treating Persistent Diarrhoea in Children. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 8: CD007401.

[63] AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for Prevention of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 9: 584–671.

[64] La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2018; 10: 11–

21.

[65] Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, et al. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 160–174.

[66] Voltan S, Castagliuolo I, Elli M, et al. Aggregating Phenotype in *Lactobacillus crispatus* Determines Intestinal Colonization and TLR2 and TLR4 Modulation in Murine Colonic Mucosa. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1138–1148.

[67] Chenoll E, Casinos B, Bataller E, et al. Novel Probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 Strain Active against the Pathogenic Bacterium *Helicobacter pylori. Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 1335–1343.

[68] Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, et al. In Vitro and In Vivo Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 518–526.

[69] Todoriki K, Mukai T, Sato S, et al. Inhibition of Adhesion of Food-borne Pathogens to Caco-2 cells by Lactobacillus strains. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 154–159.

[70] Chu H, Kang S, Ha S, et al. *Lactobacillus acidophilus* Expressing Recombinant K99 Adhesive Fimbriae Has an Inhibitory Effect on Adhesion of Enterotoxigenic Escherichia coli. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 941–948.

[71] Tsai C-C, Lin P-P, Hsieh Y-M. Three Lactobacillus Strains from Healthy Infant Stool Inhibit Enterotoxigenic *Escherichia coli* Grown in Vitro. *Anaerobe* 2008; 14: 61–67.

[72] Moreno Muñoz JA, Chenoll E, Casinos B, et al. Novel Probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. infantis CECT 7210 Strain Active against Rotavirus Infections. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 8775–8783.

[73] Wu X, He B, Liu J, et al. Molecular Insight into Gut Microbiota and Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 431.

[74] Gülden E, Wong FS, Wen L. The Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol* 2015; 159: 143–153.

[75] Morrow LE, Kollef MH. Probiotics in the Intensive Care Unit: Why Controversies and Confusion Abound. *Crit Care* 2008; 12: 160.

[76] Govender M, Choonara YE, Kumar P, et al. A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation. *AAPS PharmSciTech* 2014; 15: 29–43.

[77] Larry Jameson J, Longo DL. Precision Medicine—Personalized, Problematic, and Promising. *Obstet Gynecol Surv* 2015; 70: 612–614.

[78] Suwal S, Wu Q, Liu W, et al. The Probiotic Effectiveness in Preventing Experimental Colitis Is Correlated With Host Gut Microbiota. *Front Microbiol* 2018; 9: 2675.

[79] Chong PP, Koh AY. The Gut Microbiota in Transplant patients. *Blood Rev* 2020; 39: 100614.

[80] Kolmeder CA, Salojärvi J, Ritari J, et al. Faecal Metaproteomic Analysis Reveals a Personalized and Stable Functional Microbiome and Limited Effects of a Probiotic Intervention in Adults. *PLoS One* 2016; 11: e0153294.

[81] Ho Y-H, Lu Y-C, Chang H-C, et al. Daily Intake of Probiotics with High IFN- γ /IL-10 Ratio Increases the Cytotoxicity of Human Natural Killer Cells: A Personalized Probiotic Approach. *J Immunol Res* 2014; 2014: 1–7.

[82] Scheiman J. Promoting Peak Performance: Identifying and Isolating

Novel Probiotics from Athlete Microbiomes. In: *Proceedings of Probiota America*. Miami,EUA, 2018, p. 9.

[83] Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual Variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA Banding Patterns. *Biotechniques* 1993; 14: 214–7.

[84] Smith D, Ryan M. Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms. *Sci World J* 2012; 2012: 1–9.

[85] Smith D, Ryan MJ, W.Doelle EH. The Ex Situ Conservation of Microorganisms: Aiming at a Certified Quality Management. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of UNESCO,Oxford, UK.*

[86] Meryman HT, Williams RJ, Douglas MSJ. Freezing Injury from “Solution Effects” and its Prevention by Natural or Artificial Cryoprotection. *Cryobiology* 1977; 14: 287–302.

[87] Smith D. Tolerance to Freezing and Thawing. In: Dekker M (ed) *Jennings DH, ed. Stress Tolerance of Fungi*. New York,EUA, 1993, pp. 145–171.

[88] Richardson MJ. The UKNCC Biological Resource: Properties, Maintenance and Management edited by D. Smith, M.J. Ryan & J.G. Day (2001).Pp. 382. ISBN 0-9540285-0-3 (paperback). The UK National Culture Collection (UKNCC), Bakenham Lane, Egham, Surrey, UK. Price ??27 (in. *Mycologist* 2002; 16: 133–136.

[89] Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and Prospects of Microbial Preservation. *FEMS Microbiol Lett* 2013; 339: 1–9.

[90] Terveer EM, van Beurden YH, Goorhuis A, et al. How to: Establish and Run a Stool Bank. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23: 924–930.

[91] Barzegari A, Saeedi N, Saei AA. Shrinkage of the Human Core Microbiome and a Proposal for Launching Microbiome Biobanks. *Future Microbiol* 2014; 9: 639–656.

[92] COLLECTIONS WFFC, GUIDELINES. The WFCC Guidelines for the Establishment and Operation of Culture Collections (OnLine), http://www.wfcc.info/guidelines/ (2010, accessed 23 December 2020).

[93] Rohde C, Smith D, Martin D, et al. Code of Conduct on Biosecurity for Biological Resource Centres: Procedural Implementation. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63: 2374–2382.

[94] Kort R. Personalized Therapy with Probiotics from the Host by TripleA. *Trends Biotechnol* 2014; 32: 291–293.

[95] Nakatsuji T, Chen TH, Narala S, et al. Antimicrobials from Human Skin Commensal Bacteria Protect Against *Staphylococcus aureus* and are Deficient in Atopic Dermatitis. *Sci Transl Med* 2017; 9: eaah4680.