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.

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.

Capitulo1.

Consórcios bacterianos personalizados para o tratamento de doenças associadas à disbiose intestinal

Artigo será enviado para publicação em 2021 para o *Journal of Advanced Research*

Consórcios bacterianos personalizados para o tratamento de doenças associadas à disbiose intestinal

Eliane Vale da Silva[1], Mariane Paludetti Zubieta[2], Mariana Marchi Santoni Biasioli[1], Daniela Cardoso Umbelino Cavallini[1]

[1]Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara – Brasil

[2]Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos – Brasil

Resumo

A ingestão de probióticos, o transplante de microbiota fecal e o transplante de consórcio bacteriano são as principais estratégias utilizadas para modular a microbiota intestinal (MI) e prevenir ou tratar doenças relacionadas à disbiose. Entretanto, os efeitos de tais tratamentos são inconsistentes, provavelmente devido a resiliência da MI e às características genéticas do hospedeiro, sinalizando a necessidade de uma abordagem personalizada. O objetivo desse estudo foi a otimização da seleção e caracterização de cepas potencialmente probióticas, a partir de amostras fecais humanas e a construção de um "banco de microbiota" individualizado para terapia personalizada. As cepas comensais foram isoladas das fezes de crianças, com idades entre dois e seis anos, por plaqueamento em meios seletivos e caracterizadas por amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD-PCR), coloração de Gram, teste da catalase, sequenciamento do gene 16S rRNA, resistência gastrointestinal e suscetibilidade a antibióticos. Foram isoladas cepas pertencentes aos gêneros *Enterococcus* 45% (*E. faecium, E. faecalis, E. avium, E. Hirae* e *E. galinarrium*), seguido dos gênero *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 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 ciploxacina). 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. A proposta de construção de bancos de células microbianas potencialmente probióticas individualizados, a partir de amostras de fezes humanas, se mostrou viável e as condições de seleção foram otimizadas, utilizando uma combinação de técnicas de microbiologia convencional e biologia molecular. A estratégia representa uma opção promissora para o tratamento personalizado de doenças relacionadas à disbiose.

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

Introdução

O intestino humano abriga uma complexa e dinâmica comunidade de microrganismos comensais e patogênicos, denominada microbiota intestinal (MI), composta por trilhões de bactérias, vírus, fungos, parasitas e Archae [1]. Essa comunidade atua de forma simbiótica com o hospedeiro, exercendo inúmeras funções importantes, incluindo proteção contra patógenos, produção de nutrientes e metabólitos, modulação do sistema imune e regulação do armazenamento de gordura [2–4].

Ao longo dos anos, vem sendo elucidado o papel fundamental da MI na manutenção da saúde e como a disbiose interfere na resposta imune do hospedeiro e patogênese de doenças intestinais (exemplo: doença de Crohn, colite ulcerosa) e extra intestinais (obesidade, diabetes, doença alérgicas, autoimunes e do sistema nervoso central) [5, 6]. Após os dois ou três anos de idade, a MI adquire certa estabilidade, que pode ser alterada devido ao uso indevido ou excessivo de alguns medicamentos, estilo de vida (dieta, tabagismo e prática de exercício), presença de doenças e fatores psicológicos [7, 8].

Considerando a importância da MI na manutenção da homeostase do organismo, diferentes abordagens têm sido utilizadas para modular essa comunidade de microrganismos, merecendo destaque o transplante de microbiota fecal (TMF), o transplante de consórcio bacteriano, o uso de probióticos e recentemente as terapias personalizadas. O TMF envolve a infusão de material fecal, minimamente processado e proveniente de um doador saudável, em um paciente portador de doença relacionada à disbiose. Essa abordagem vem sendo aplicada com sucesso em pacientes que apresentam infecções intestinais recorrentes por *Clostridium difficile* [9]. Entretanto, existem vários questionamentos relacionados à aceitação do paciente e segurança em relação à possibilidade de transmissão de patógenos, aparecimento de efeitos adversos (dor abdominal, febre, diarreia, flatulência) e alterações no metabolismo do receptor [9–11]. Uma alternativa ao TMF é o transplante de consórcio bacteriano, onde cepas são isoladas de um doador saudável e selecionadas considerando o objetivo do tratamento, o que aumenta a segurança da terapia[12].

A administração oral de microrganismos probióticos, veiculados em alimentos ou em formas farmacêuticas, também pode ser utilizada para modular a MI, atuando

como adjuvante no tratamento de diferentes doenças intestinais [13, 14]. Em humanos, os microrganismos probióticos apresentam diferentes padrões de colonização, que dependem de uma combinação única entre características genéticas do hospedeiro e composição do seu microbioma (microbiota e seu material genético) e que permitem dividir a população em voluntários permissivos e resistentes [15]. Essa característica, juntamente com a capacidade de resiliência da microbiota humana, poderia explicar a discrepância de resultados obtidos com o uso de probióticos para modular a comunidade microbiana intestinal e auxiliar no tratamento de diferentes doenças. A personalização da terapia com probióticos seria uma forma de respeitar as características específicas de cada indivíduo e maximizar os efeitos benéficos à saúde.

As terapias personalizadas ou de precisão já são bastante utilizadas para identificar alterações genéticas relacionadas à incidência, severidade e recorrência das doenças e permitir uma abordagem mais eficiente, seja pela adoção de medidas preventivas ou para auxiliar na escolha do tratamento adequado ao paciente [16–18]. A oncologia, apoiada em dados gerados pela triagem genômica específica, é a área mais beneficiada pela terapia de precisão [19, 20], mas a caracterização do microbioma humano e da sua relação com a saúde abriu a perspectiva de utilizar tais conhecimentos no manejo de outras doenças.

As terapias personalizadas com cepas probióticas são ainda pouco exploradas e normalmente utilizam cepas isoladas de voluntários saudáveis para melhorar a performance de grupos específicos da população, como atletas [21] e auxiliar no tratamento de certas doenças [22, 23]. Em 2014, Kort propôs a Triple A, que prevê a coleta de material biológico da microbiota de indivíduo portador de uma doença e o cultivo dessa amostra em condições especificas que estimulem a multiplicação de bactérias benéficas (*Lactobacillus* spp.) em detrimento às patogênicas. Esses microrganismos poderiam ser utilizados para produzir medicamentos para o tratamento de doenças, como vaginose bacteriana, porém ainda não foi testado em modelos *in vivo*. Em outro estudo, Nakatsuji et al. (2017) isolaram da pele de voluntários saudáveis e portadores de dermatite atópica, cepas de *Sthaphylococcus hominis* ou *Sthaphylococcus epidermidis* produtoras de substâncias antimicrobianas contra *Sthaphylococcus aureus*. As cepas isoladas foram utilizadas para formular um

creme para tratamento da dermatite e os resultados foram positivos em relação à formulação controle.

Em estudo concluído em (2018), nosso grupo propôs a utilização da terapia probiótica personalizada para reverter a disbiose intestinal e atenuar os quadros de doenças associadas. Esse tratamento personalizado prevê o isolamento de cepas potencialmente probióticas das fezes do indivíduo saudável e o seu armazenamento em um banco de células ("banco de microbiota"), para serem utilizadas posteriormente como adjuvante no tratamento de doenças relacionadas à disbiose, que venham a se desenvolver no próprio indivíduo doador das cepas. O primeiro estudo utilizando essa abordagem utilizou a terapia personalizada com probióticos para o tratamento de colite induzida por *Dextran Sulfate Sodium* (DSS) em modelo animal. Os resultados evidenciaram que o tratamento personalizado foi eficaz em reduzir os sintomas da colite durante o período de indução da doença, resultou em menor alteração histológica no cólon e melhora no perfil de citocinas (aumento de IL-10 e TGF- β e redução de IL-1β e IL-6)[24]. A principal diferença entre os trabalhos de Kort (2014), Nakatsuji et al. (2017) e o realizado pelo nosso grupo de pesquisa é o fato de propormos a coleta de microrganismos e o estabelecimento do "banco de microbiota" a partir de amostras de voluntários saudáveis, preferencialmente, durante a primeira infância, que corresponde ao período em que a microbiota do indivíduo já está formada e que as doenças ainda não se manifestaram.

No estudo inicial realizado pelo nosso grupo, com camundongos isogênicos e *Specific Pathogen Free,* foram isoladas duas cepas de *Bifidobacterium* spp. e uma de *Lactobacillus* spp. de cada animal e o grande desafio dessa proposta consiste em selecionar um número maior de cepas, que possa ser armazenado a longo prazo, de forma segura e confiável. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi a otimização da seleção e caracterização de cepas potencialmente probióticas, a partir de amostras fecais de criança saudáveis e a construção de um "banco de microbiota" personalizado para cada criança.

Materiais e Métodos

Sujeitos da Pesquisa

O grupo de voluntários foi formado por crianças (n=5) **(Tabela 1)**, com idades entre dois e seis anos de idade, sem problemas de saúde previamente identificados. Os seguintes critérios de exclusão foram utilizados: doenças gastrointestinais, diabetes, imunodeficiência e terapia com antibióticos nos últimos dois meses. Além disso, foi solicitada a não ingestão de probióticos durante 10 dias antes da coleta das fezes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF, Araraquara/, SP (n°:14569519.4.0000.5426) (Apêndices 1,2,3) e seguiu todas as normas do Conselho Nacional de Saúde sobre armazenamento e à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa (RESOLUÇÃO CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011) (Apêndice 4),

Tabela 1. Caracterização dos participantes.

Voluntários	*Sexo*	*Idade*	*Aleitamento materno*	*Tipo de parto*	** Uso antibiótico*	*IMC (Kg/m2)*
1	F	5	15 meses	Cesária	Não	15,14
2	F	2	14 meses	Cesárea	Não	17,02
3	M	3	2,5 meses	Normal	Sim	13,60
4	F	5	6 meses	Cesária	Não	17,00
5	F	2,5	7 meses	Cesária	Sim	15,50

*IMC: Índice de Massa Corporal, relação entre o peso e altura da criança; F: Feminino; M: Masculino; * Uso de antibióticos no último ano.*

Coleta das amostras

As fezes, coletadas por um responsável pela criança, foram armazenadas em recipientes estéreis fornecidos pelo pesquisador e imediatamente acondicionadas sob refrigeração, por um período máximo de 15 horas. Após esse período, as amostras foram conduzidas ao laboratório, homogeneizadas, alíquotadas em triplicata e armazenadas a - 80 °C As coletas das amostras de cada voluntário foram realizadas em três ocasiões distintas, com intervalo de uma semana, para maximizar as chances de selecionar diferentes cepas.

Isolamento das cepas comensais potencialmente probióticas para a terapia personalizada

As amostras foram preparadas em duplicata, em ambiente estéril, diluídas em água peptonada a 1 % (1:9 m/v) e homogeneizadas por dois minutos (agitador automático, Nova Ética). A seguir, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-10} e plaqueamento em meios seletivos pelo método *pour plate*. Para o isolamento das cepas foram utilizados os meios: ágar *Man Rogosa Sharpe* (MRS – HIMEDIA / Índia) e o meio BIM-25 (Ágar *Reinforced Clostridium* - NEOGEN Corporation/USA, com adição de ácido nalidíxico, sulfato de polimixina B, sulfato de canamicina, ácido iodoacético e cloreto trifenil tetrazólio), ambos com incubação a 37 ºC / 48 h em anaerobiose, com intuito de isolar bactérias láticas e do gênero *Bifidobacterium*, respectivamente. Colônias com morfologias macroscópicas distintas (cor, textura, formação de halos e formatos) foram transferidas para o meio nutritivo líquido *Brain Heart Infusion* (BHI – Laboratório KASVI/Espanha) e incubadas a 37 ºC / 24 h em anaerobiose. Para purificação da cepa selecionada, realizou-se estriamento nos meios seletivos MRS ou BIM-25 (incubação a 37 ºC / 48 h em anaerobiose) e seleção de uma única colônia da placa. Essa etapa foi repetida pelo menos uma vez, antes da realização da técnica de RAPD-PCR.

Extração do DNA das cepas utilizadas na padronização de RAPD – PCR

Para a padronização da técnica de RAPD-PCR foram utilizadas cepas com procedências conhecidas de *Bifidobacterium* spp. (*Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis - BB-12 Chr. Hansen, doada pela Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes, do Laboratório de Lácteos, Probióticos e Prebióticos da Unicamp) e *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus acidophillus* CRL1014 - Centro de Referência para Lactobacilos – CERELA/San Miguel de Tucumán, Argentina). A extração de DNA das cepas seguiu a metodologia proposta por Alimolaei e Golchin (2016), utilizando os meios líquidos MRS ou BIM-25 para cultivo das cepas.

Caracterização genotípica das cepas bacterianas por RAPD-PCR

A seleção preliminar das cepas potencialmente probióticas foi realizada por RAPD-PCR, aplicadas à colônia pura (sem a etapa de extração de DNA).

Para a otimização da técnica de RAPD-PCR foram testadas quatro concentrações diferentes de $MgCl_2$ (1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM e 2,5 mM - Thermo Scientific/Europa) e de *primers* (2,0 μM; 2,5 μM; 3,0 μM e 3,5 μM - Sigma-Aldrich/USA). As sequência dos *primers* escolhidos foram P5 (5 'AAC GCG CAAC' 3) [27] e OPL-07 (5'AGG CGG GAA C' 3), na tentativa de selecionar diferentes bactérias láticas e *Bifidobacterium* spp. A quantidade de cultura microbiana utilizada para a reação de RAPD foi estabelecida em testes prévios, onde foram avaliadas duas diluições diferentes da cepa: a) colônia + 35 μL de H_2O ultrapura; b) colônia + 20 μL de H_2O ultrapura. A menor diluição resultou em melhor amplificação das reações, sendo utilizada em todos os testes de padronização, em um volume de 1 μL.

A princípio, a otimização foi realizada somente para *Lactobacillus* spp., utilizando a cepa controle *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. As mesmas condições padronizadas foram testadas para *Bifidobacterium* spp. e, caso fosse necessário, a otimização seria realizada também para esse gênero.

As reações para otimização da técnica foram preparadas com volume final de 25,0 μl contendo: 1,0 μl de colônia pura diluída em 20,0 μl de H_2O ultrapura, 10 mM de mix de dntps, 1,25 U Taq Polimerase (Thermo Scientific/Europa), tampão 1 X, primers e $MgCl_2$ em diferentes concentrações e H_20 ultrapura. Todas as reações foram acompanhadas de controle positivo, utilizando a cepa *Lactobacillus acidophillus* CRL1014. A otimização da reação foi feita com o DNA (≅3ng) e com as colônias puras. As reações foram realizadas em termociclador da Marca Veriti™ 96-wells, utilizando as condições propostas por Kakelar et al., (2019), com modificações: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min., 43 °C por 50 s (redução de 0,33 °C por ciclo) e 72 °C por um min. Após 20 ciclos, as condições foram alteradas para 94 °C por 50 s, 38 °C por 50 s, 72 °C por um min. por mais 30 ciclos, com a extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos das reações (8 μl do produto da reação e 2 μl de carregador - Thermo Scientific/Europa) foram separados em gel de agarose a 1,5% por 40 min., a 80V, com tampão TAE 1 X, usando o corante *SyberSafe* (Thermo Scientific/Europa) e marcador de 1Kb.

Coloração de Gram e teste de catalase

As cepas selecionadas pelo teste de RAPD-PCR foram inicialmente caracterizadas pelo método de coloração de Gram [28], sendo classificadas em cocos ou bastonestes, Gram positivos ou Gram negativos. As lâminas foram analisadas em microscópio trinocular com sistema de videomicroscopia e análise de imagens (E200, Nikon, Japão). A expressão da enzima catalase foi avaliada pela adição de peróxido de hidrogênio 3% [28].

Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA amplificado, resultante da PCR 16S rDNA foi purificado usando o Kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen,EUA), de acordo com as especificações do fabricante e a qualidade do material genômico foi avaliada em espectrofotômetro do tipo NanoDrop (Thermo Scientific/EUA). O sequenciamento foi realizado no Laboratório Multiusuários de Análises Biomoleculares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Araraquara, utilizando o equipamento Applied Biosystems® 3130/3130xl Genetic Analyzers, EUA e o Kit BigDye (Thermo Fisher Scientific), seguindo os padrões de preparo do fabricante. A PCR 16S rDNA e o sequenciamento das cepas foram realizados usando os conjuntos de primers: Lab-0159: 5’ GGA AAC AG (A/G) TGC TAA TAC CG 3’; Lab-0677: 5’ CAC CGC TAC ACA TGG AG 3’) (Sigma-Aldrich,USA)[29] para as cepas isoladas com o meio de cultura MRS e 27: 5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’; 1495: 5’ CTACGGCTACCTTGTTACGA 3’) (EXXTEND-Brasil) [30] para cepas isoladas com BIM-25, respeitando as condições de amplificação propostas pelos autores [29, 30]. As reações de PCR 16S rDNA foram preparadas com volume final de 25 µl, contendo:1µl de colônia pura diluída em 20µl de H_2O ultrapura, 10 mM de mix de dntps; 1,25U Taq Polimerase (Thermo Scientific,Europa); tampão 1x; 1,0 mM de $MgCl_2$ e H_20 ultrapura. Os fragmentos sequenciados foram analisados no Software *Sequence Scanner 2* (Applied Biosystems/USA) e o alinhamento dos fragmentos de nucleotídeos foi realizado no *GeneBank* (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI)), usando a ferramenta BLASTn.

Resistência ao fluido gástrico e intestinal simulados

As cepas que apresentaram padrões diferentes de bandas no RAPD-PCR, teste da catalase negativo, morfologia de bastonetes/cocos Gram positivos e confirmação de espécie para cepas potencialmente probióticas, foram submetidas à avaliação da sobrevivência gastrointestinal. A simulação da digestão *in vitro* foi realizada segundo protocolo estático INFOGEST, conforme proposto por Minekus et al. (2014). As cepas foram diluídas (1:9) em H_2O peptonada a 1% e a incubação das diferentes fases avaliadas (salivar, gástrica e intestinal) foi feita em banho tipo Dubnoff (Incubator Shaker, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil). Antes e após cada fase, as cepas foram diluídas e plaqueadas em ágar MRS ou BIM-25 (incubação a 37°C/ 48 horas em anaerobiose), para determinação da viabilidade dos microrganismos potencialmente probióticos. Todas as células bacterianas iniciaram a análise com população a 9 ou 8 $\log_{10}$ UFC/mL.

Susceptibilidade a antibióticos

A susceptibilidade a antimicrobianos de cada cepa isolada foi testada contra sete antibióticos diferentes (ampicilina 10 µg, estreptomicina 10 µg, eritromicina 15 µg, vancomicina 30 µg, cloranfenicol 30 µg, tetraciclina 30 µg e ciprofloxacina 5 µg), usando o ensaio de difusão em discos (SENSIFAR/Brasil) [32, 33]. As culturas bacterianas frescas foram diluídas em solução salina 0,9% até turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland (10^8 UFC / mL). Após o ajuste da concentração, foi realizada a semeadura em superfície, em placas de MRS ou BIM-25, com o auxílio de um swab estéril. Os discos de antibiótico foram distribuídos nas placas e as mesmas foram incubadas sob condições anaeróbias a 37 °C, durante 24/ 48h. O diâmetro da zona sem crescimento detectável ao redor de cada disco foi considerado halo de inibição e as cepas foram categorizadas como sensíveis (≥ 20 mm), intermediárias (15-19 mm) ou resistentes (≤ 14 mm), de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [32]

“Banco de Microbiota”

A partir das cepas potencialmente probióticas selecionadas, sequenciadas e caracterizadas foi criado um banco de células bacterianas para cada criança (“banco

de microbiota" personalizado), utilizando a técnica de criopreservação e seguindo as especificações do guia da *American Type Culture Collection* (ATCC), em cooperação com a *Thermo Fisher Scientific* [34]. Inicialmente, foi inoculado 0,5 mL da cepa bacteriana em 5,0 mL de meio específico (MRS ou RCM+L-cisteína à 1%), seguido de incubação a 37ºC, por 48h em anaerobiose. A seguir, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-10} e plaqueamento, pela técnica de microgotas, para enumeração e controle de células microbianas viáveis. Segundo especificações do guia, as células devem apresentar uma quantidade mínima de 10^7 UFC/g antes da criopreservação. Após a enumeração, as células bacterianas foram centrifugadas por 10 min (2.800 g) (CENTRBIO, Brasil) e o *pellet* obtido foi adicionado de 2,5 mL de meio de cultura novo e 10% de glicerol. Alíquotas de 0,5 mL foram distribuídas em cinco tubos de criopreservação de 1,0 mL e preservadas à temperatura de - 80 °C. Para auxiliar na manutenção da estabilidade genética das células cultivadas foi criado um sistema de lote de sementes, conforme indicado no guia.

Destacamos que, por se tratar de um estudo personalizado, as células bacterianas isoladas e armazenadas não serão utilizadas para outros voluntários humanos e serão mantidas somente até a finalização do projeto.

Resultados e discussão

Otimização da técnica de RAPD-PCR para cepas puras e DNA.

Na seleção preliminar das cepas potencialmente probióticas utilizou-se a técnica de RAPD-PCR aplicadas à colônia pura, visando a rapidez e a redução de custo do procedimento. Essa técnica é considerada sensível, rápida e simples e tem sido usada com sucesso para diferenciar cepas de várias espécies de bactérias láticas [35–37]. Porém, está sujeita à baixa reprodutibilidade nos padrões de banda, necessitando de otimização, de acordo com sua aplicação [38].

Para a otimização da reação foram testadas diferentes concentrações de *primers* (Figura 1) e de $MgCl_2$ (Figura 2), utilizando 1,0 µl de colônia pura (diluída em 20,0 µl de H_2O) ou DNA (≅ 3ng), com volume final de 25,0 µl.

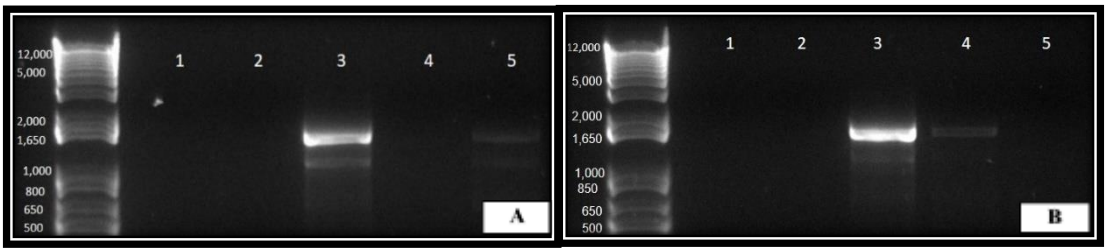


Figura 1. Otimização da concentração de *primers* para a reação de RAPD-PCR utilizando DNA (A) e cepa pura (B) de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. Canaleta 1: Controle negativo; Canaleta 2: 2,0 µM; Canaleta 3: 2,5 µM; Canaleta 4: 3,0 µM e Canaleta 5: 3,5 µM.

Para ambas as reações (DNA e colônia pura), o melhor padrão de bandas foi obtido com 2,5 µM de *primers* (Figura 1 A e B). O *primer* é considerado crucial para o sucesso de qualquer protocolo de RAPD-PCR, que possui potencial de detectar polimorfismos entre cepas, permitindo a diferenciação, mesmo de cepas estreitamente relacionadas pertencentes a mesma espécie [39]. Os diferentes padrões de bandas do RAPD-PCR resultam da variação da sequência nos locais de iniciação ou variação do comprimento na sequência alvo situada entre os locais de ligação do iniciador. Alguns estudos indicam que a concentração ideal de cada *primer* deve ser otimizada para cada tipo de modelo de DNA gênomico e aplicação pretendida [38, 40]. De acordo com Towner e Grundmann [41], uma vez que a especificidade do processo de amplificação depende das interações com o *primer*, pode-se esperar que alterações na concentração do DNA ou *primer* afete a natureza precisa dos produtos de PCR amplificados, resultando em diferentes impressões digitais de RAPD-PCR.

Para a reação com DNA, a melhor concentração de $MgCl_2$ foi de 1,0 µM (Figura 2A), enquanto para colônias puras, a concentração de 2,5 µM mostrou-se mais eficiente para reação de RAPD-PCR (Figura 2B).

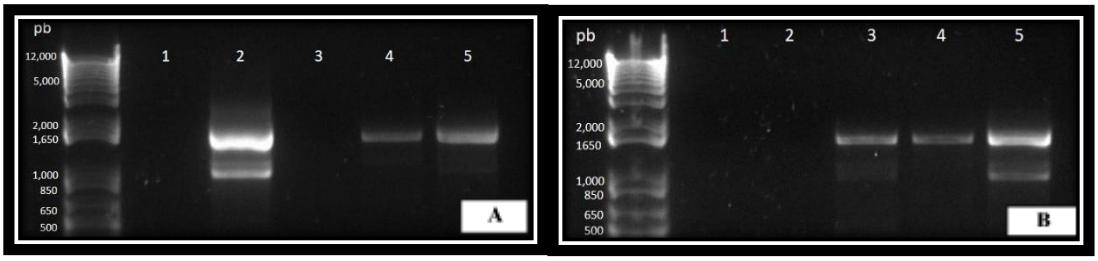


Figura 2. Otimização da concentração de $MgCl_2$ para a reação de RAPD-PCR utilizando DNA (A) e cepa pura (B) de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. Canaleta 1: Controle negativo; Canaleta 2: 1,0 mM; Canaleta 3: 1,5 mM; Canaleta 4: 2,0 mM e Canaleta 5: 2,5 mM.

O $MgCl_2$ é um doador estável de íons Mg2+, que são cofatores indispensáveis para atividade da enzima Taq polimerase. Dessa forma, a concentração de $MgCl_2$ apresenta grande influência sobre o anelamento dos *primers*, perfis de bandas e reprodutibilidade da reação de RAPD-PCR, além de relacionar-se à especificidade e rendimento da reação. A falta de $MgCl_2$ foi associada à redução do rendimento, enquanto o excesso resulta em amplificação não especifica [42].

Analisando dados da literatura, verifica-se uma grande variação na concentração ótima de $MgCl_2$ para reações de RAPD-PCR. Benter et al. (1995) recomendaram menores concentrações de $MgCl_2$ em reações com DNA para evitar anelamento não específico dos *primers*, sendo que a concentração de 1,5 mM foi considerada satisfatória para o gênero *Lactobacillu*s spp. [44–46].

Destacamos que a maioria dos estudos que avaliou o efeito da concentração de $MgCl_2$ na reação de RAPD-PCR, utilizou DNA, enquanto no presente estudo realizou-se a reação a partir da colônia isolada, o que pode ter influenciado nos resultados obtidos. Em geral, protocolos que usam colônias puras como molde de DNA adotam concentrações superiores a 1,5µM de MgCl2, para garantir a obtenção de padrões de bandas de qualidade satisfatória e capazes de distinguir cepas diferentes, corroborando assim com os resultados encontrados neste trabalho [47–49]. Tais resultados podem estar relacionados com a quantidade e qualidade do DNA proveniente da cepa pura, que por não ser extraído, apresenta concentração indefinida e pode conter impurezas.

Após definir as concentrações de $MgCl_2$ (1,0 mM DNA, 2,5 mM colônia pura) e primers (2,5 µM DNA/Colônia pura), foram realizadas algumas modificações nas condições de amplificação inicial (quantidade de ciclos), com o intuito de melhorar a natureza qualitativa das impressões digitais amplificadas. Condições ajustadas e entre parênteses condições anteriores: 1 ciclo inicial 94 °C por 10 minutos, anelamento 45 °C por 50 s, 72 °C por um minuto, por 20 ciclos (15 ciclos), diminuindo 0,33 °C por ciclo. Após 20 ciclos, 94 °C por 50 s, 38 °C por 50 s, 72 °C por 1 minuto por mais 30 ciclos (25 ciclos) e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Por fim, as modificações nas concentrações e condições de reação foram aplicadas para os dois gêneros de interesse – *Lactobacillus* spp. (Figura 3A) e *Bifidobacterium* spp. (Figura 3B).

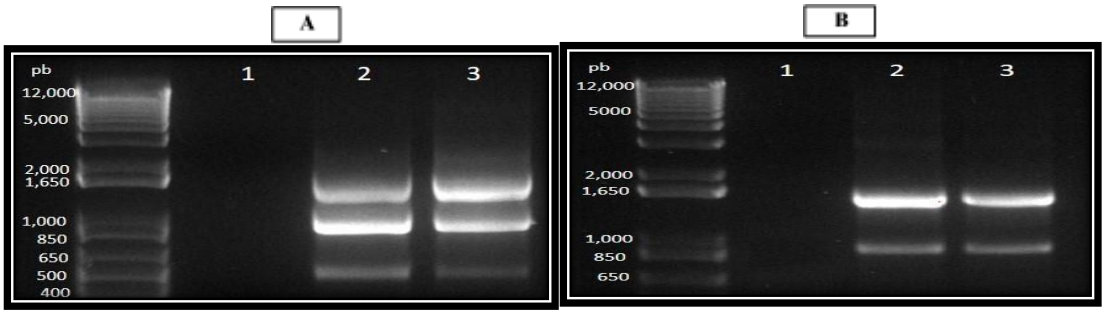


Figura 3: Reações de RAPD PCR otimizadas para DNA e cepa pura de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 (**A**) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (B). Canaleta 1: Controle negativo; Canaleta 2: DNA; Canaleta 3: Colônia pura (Diluída em 20µl H_2O.

Após a otimização da técnica e considerando o custo da análise e a grande quantidade de cepas a serem testadas, optou-se pela utilização de um volume final de reação de 10 µl, mantendo-se as concentrações dos reagentes, a fim de reduzir ainda mais os custos da análise.

Seleção das cepas potencialmente probióticas isoladas da microbiota dos participantes pela técnica de RAPD-PCR

Com a técnica de RAPD-PCR com colônia pura otimizada, deu - se início a seleção preliminar das cepas potencialmente probióticas, a partir das amostras de fezes dos participantes. Inicialmente, as amostras fecais foram plaqueadas nos meios seletivos MRS e BIM-25 e colônias com morfologias diferentes foram isoladas para análise de RAPD-PCR. Nessa etapa, para obtermos um maior número de cepas distintas (padrões de bandas diferentes), foi estabelecida a seleção de pelo menos 20 cepas de cada um dos meios (MRS/BIM-25), em cada uma das coletas realizadas. Imagens representativas dos resultados de RAPD-PCR, obtidos com as cepas selecionadas dos meios MRS e BIM-25 são apresentadas nas Figura 4 e 5, respetivamente (imagens das cepas selecionadas de cada voluntário são apresentadas nos apêndices 5 a 9).

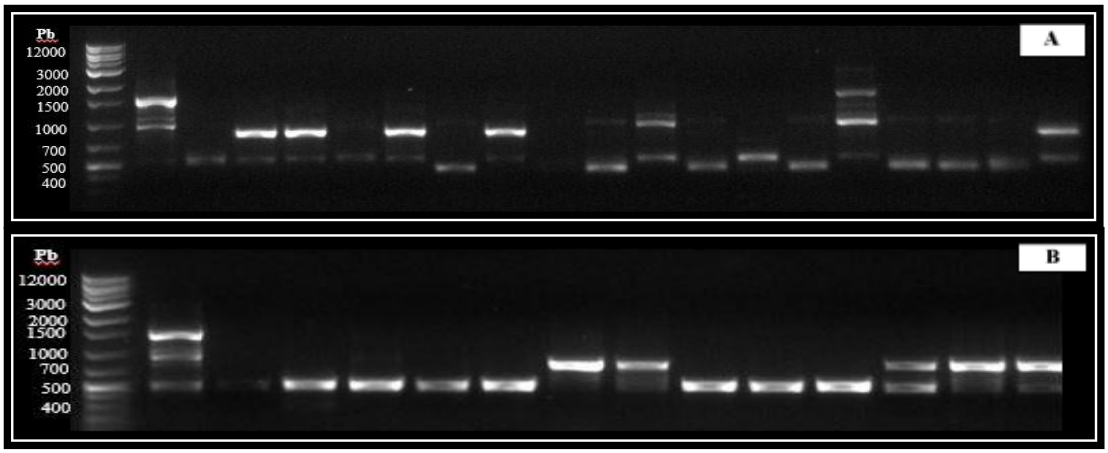


Figura 4. Imagens representativas da reação RAPD-PCR para cepas isoladas da microbiota fecal no meio MRS dos voluntários 4 (**A**) e 5 (**B**).

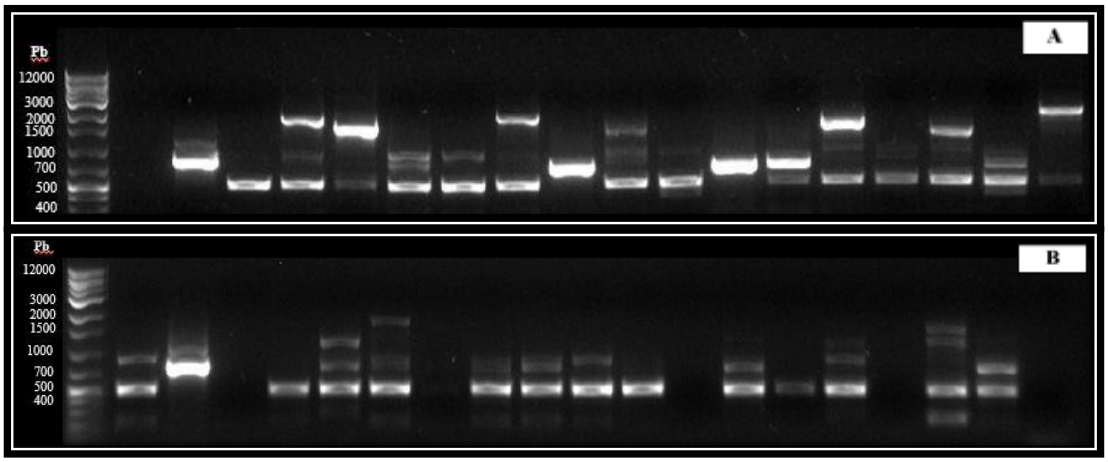


Figura 5. Imagens representativas da reação RAPD-PCR para cepas isoladas da microbiota fecal no meio BIM-25 dos voluntários 4 (**A**) e 5 (**B**).

A análise de RAPD-PCR gerou muitos fragmentos amplificados, com uma faixa de tamanho heterogênea (400pb à 3000pb), possibilitando a seleção inicial de diferentes cepas potencialmente probióticas. O resumo da seleção inicial das cepas por voluntário é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Resumos da seleção inicial das cepas potencialmente probióticas, por voluntário.

Voluntário	Meios de cultura	Colônias selecionadas*	Cepas distintas RAPD-PCR**
1	MRS	59	6
	BIM-25	56	8
2	MRS	50	5
	BIM-25	43	9
3	MRS	55	8
	BIM-25	34	4
4	MRS	31	5
	BIM-25	34	6
5	MRS	37	3
	BIM-25	47	9

* Colônias com morfologias diferentes. ** colônias com perfis distintos na RAPD-PCR.

Com a técnica de RAPD-PCR foi possível selecionar entre 11 e 14 cepas diferentes para cada voluntário, representando de 12,1% a 16,9% das cepas pré-selecionadas por paqueamento. Em geral, houve um equilíbrio nas quantidades de cepas selecionadas entre os meios MRS e BIM-25, que foram utilizados na tentativa de selecionar bactérias láticas e *Bifidobacterium* spp. Destacamos que houve perda de algumas cepas durante o processo de purificação, principalmente das isoladas no meio BIM-25, provavelmente devido à alta sensibilidade ao oxigênio de microrganismos anaeróbios estritos presentes na MI [50].

Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas isoladas da microbiota fecal de cada voluntário

As cepas selecionadas por RAPD-PCR foram, inicialmente, caracterizadas por coloração de Gram e teste de catalase. Todas que apresentaram morfologia característica – bastonetes/cocos e foram classificadas como Gram-positivas e catalase negativas (Tabelas 3 a 7), conforme preconizado para bactérias láticas e *Bifidobacetrium* spp.[51], foram sequenciadas a partir da amplificação do gene 16S rRNA para identificação de espécie.

Para que uma cepa probiótica seja capaz de colonizar o trato gastrointestinal e promover a saúde do hospedeiro, propriedades funcionais como tolerância às condições gastrointestinais (baixo pH, presença das enzimas pepsina, pancreatina e tolerância aos sais biliares), bem como o aspecto de segurança, que incluem resistência antimicrobiana devem ser analisadas.

As bactérias probióticas compreendem diferentes espécies, incluindo bactérias ácido láticas (BAL), *Bifidobacterium* spp., leveduras e algumas cepas Gram-negativas específicas, como *Escherichia coli* [16]. As BALs são um grupo muito heterogêneo de microrganismos composto por diferentes gêneros, sendo os principais e mais conhecidos: *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Leuconostoc* spp. [52, 53]. Neste estudo foi possível isolar cepas de bactérias láticas das amostras fecais dos cinco voluntários (Tabelas 3 a 7), com predomínio de *Enterococcus* spp. 45,0% (*E. faecium, E. faecalis, E. avium, E. hirae, E. galinarrium)* seguido dos gênero *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 pertencentes ao filo *Firmicutes*, fato este que pode estar ligado a faixa etária (3 a 5 anos) dos voluntários dessa pesquisa.

Até aproximadamente três anos de idade, os filos predominantes na MI humana são *Actinobacteria* (filo a qual pertence o gênero *Bifidobacterium*), seguido por *Firmicutes* e *Bacteroidet*es. Após essa idade a MI passa por um processo de amadurecimento e assemelha-se com a dos adultos, com predomínio do filo *Firmicutes*, seguido dos filos *Actinobactéria* e *Bacteroidetes*. Em adultos acima de 70 anos de idade, ocorre um aumento na abundância dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e diminuição de *Firmicutes* [54, 55]. Apesar da aparente similaridade entre a composição da microbiota de adultos saudáveis, que de acordo com a variação de alguns gêneros pode ser dividida em enterótipos, a comunidade de microrganismos que habita o intestino parece ter características únicas, com uma estrutura que permanece estável ao longo dos anos [4, 56].

Em relação às cepas isoladas para cada indivíduo neste estudo, observamos predomínio de *Lactobacillus paracasei* em três voluntários (1, 2, 3). Esses resultados se assemelham aos de outros estudos que realizaram isolamento e caracterização de bactérias com potencial probiótico de fezes de crianças, usando metodologia parecida

e resultaram no isolamento de um maior número de cepas do gênero *Lactobaccillus* spp. incluindo as espécies *Lactobacillus paracasei, Lactobacillus plantarum e Lactobacillus rhamnosus* [29, 57, 58]. Tais espécies possuem potencial aplicação comercial e são utilizadas em produtos farmacêuticos e alimentos probióticos em função de sua segurança e efeitos benéficos à saúde [59].

As cepas *L. paracasei* são consideradas moduladoras potentes da composição e função da MI e do sistema imune, atuando na redução dos sintomas de doenças inflamatórias intestinais. Estudo conduzido por Kim et al. (2019) concluiu que o tratamento com *L. paracsei* KBL 382, 384 e 385 resultou em melhora significativa nos sintomas de colite, induzida em camundongos por Dextran sulfato de sódio. Houve redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-6), aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, das populações de células T regulatórias (CD4, CD25 e Foxp3) e dos níveis de proteínas de junção e oclusão e da camada protetora de muco [60]. Essa espécie também está envolvida na modulação da resposta imune em crianças com doença celíaca [61] e na regulação de respostas imunes mediadas por macrófagos [62].

Para o voluntário 1 (Tabela 3) também foi isolada uma cepa de *L. rhamnosus*, produtora potencial de ácido graxo de cadeia curta, com atividade antimicrobiana contra uma variedade de espécies bacterianas dos gêneros *Clostridium, Bacteroides, Escherichia, Pseudomonas, Sthaphylococcus, Streptococcus, e Salmonella*, algumas dessas envolvidas em doenças gastrointestinais [63]. Essa espécie também se mostrou eficaz na recuperação mais rápida em casos de diarreia aquosa aguda e na atuação metabólica do colesterol, diminuindo concomitantemente o colesterol e a quantidade de triglicerídeos [64–66].

O genêro *Enterococcus* foi bastante isolado nos voluntários 1, 2, 3 e 4, com predomínio de *Enterococcus faecium*, seguido das espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus. hirae*, *Enterococcus avium* e *Enterococcus gallinarum.* Esse é o terceiro gênero mais abundante entre as BALs, depois de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp., com as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* sendo as mais encontradas em fezes humanas e com algumas cepas utilizadas como probióticas [67]. Geralmente são administradas em formas farmacêuticas e utilizadas para auxiliar no tratamento de diarreia, diarreia associada a antibióticos ou síndrome do intestino irritável, com efeitos benéficos cepa-dependentes associados à modulação do perfil lipídico e do

sistema imune [68]. *E. faecalis* mostrou ter ação inibidora do crescimento do patógeno *Salmonella typhimurium* [69], enquanto cepas da espécie *E. hirae* foram apontadas como redutoras de níveis de lipídeos séricos, reguladoras do metabolismo de glicolipídios e melhora no diabetes tipo 2 em ratos [70].

Streptococcus salivares, comumente encontrado na microbiota oral e intestinal, foi isolado somente nos voluntários 1 (Tabela 3) e 4 (Tabela 6). Os efeitos probióticos dessa espécie ainda são restritos e incluem ação inibitória, pela produção de bacteriocinas, contra patógenos das espécies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus vestibulares*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* [71, 72].

O voluntário 5 (Tabela 7) apresentou a menor diversidade entre as cepas selecionadas, com a identificação de somente duas espécies: *Weisella confusa* e *Leuconostoc lactis*, fato que pode estar relacionado a especificidade da MI e ao estilo de vida da criança. *W. confusa* ainda não foi aprovada para uso comercial como cultura inicial em alimentos fermentados, ou para ração animal nos Estados Unidos ou na Europa, provavelmente pela falta de comprovação de segurança. Cupi e Signe Gry (2019) avaliaram a segurança de *W. confusa* e não encontraram nenhum potencial genotóxico ou atividade mutagênica nas condições testadas. O Comitê Alemão de Agentes Biológicos determinou que *W. confusa* pertence ao Grupo de Risco 1, o que significa que é improvável que causem doenças humanas. Esta espécie parece ser onipresente no trato gastrointestinal de humanos e animais vertebrados saudáveis, independentemente da idade, porém são mais abundantes nas fezes de pacientes saudáveis e menos abundantes em pacientes com síndrome do intestino irritável [74].

As bactérias do gênero *Leuconostoc* são bactérias heterofermentativas consideradas de uso seguro, podendo vir a ser empregadas como cepas potencialmente probióticas. São comumente associadas a alimentos e utilizadas como bactérias iniciadoras em algumas fermentações lácteas [75], se destacando a espécie *Leuconostoc lactis* que desempenha um papel importante na produção de compostos aromáticos e de bacteriocinas, como a leucocina. Suas propriedades bactericidas incluem a inibição de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella* spp. e *Serratia* spp, [71]. Na indústria de

alimentos podem ser usadas como aditivos alimentares devido as suas propriedades nutricionais e organoléticas [76].

Embora espécies de *Bifidobacterium* spp. constituam quase 10% da MI humana, especialmente de crianças, nenhuma cepa pertencente a este gênero foi isolada no presente estudo. Uma possível explicação para esse resultado é a elevada sensibilidade desses microrganismos ao oxigênio [52], o que explicaria a perda de cepas isoladas no meio BIM-25, específico para o gênero *Bifidobacterium* spp., durante o processo de purificação dos microrganismos isolados. Algumas estratégias para aumentar as chances de isolar *Bifidobacterium* spp. incluem a utilização de diferentes meios de cultura como ágar propionato TOS (*transgalactosylated oligosaccharides*) e BL [77]; ágar TPY (*Trypticase phytone yeast extract*) com adição de mupirocina (100 mg / L) e ácido acético concentrado (1 ml / L)[78] e a inclusão de uma etapa para seleção prévia de cepas mais resistentes (incubação em meio TP, com ajuste de pH para 2,0 e adição de 1.5% oxgall) [79].

Destacamos ainda que, mais de uma cepa pertencente à mesma espécie foi isolada de cada voluntário, indicando que apesar de serem semelhantes possuíam alguma variação genética, identificada pelo padrão de bandas diferente no RAPD-PCR. Essas pequenas variações são, muitas vezes, importantes, pois podem indicar adaptação a uma situação de estresse ou capacidade de produzir um metabólito específico associado ao efeito benéfico pretendido[80, 81].

Tabela 3. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas isoladas da microbiota intestinal do indivíduo 1.

N°	Cepa	N° acesso Genbank	Id. (%)	Gram	Cat.	Sensibilidade antimicrobiana (mm)							Digestibilidade log10 CFU/mL		
						AMP	ERI	EST	TET	VAN	CIP	CLO	SSF	SGF	SIF
1.1	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	40(S)	40.0(S)	0(R)	33(S)	0(R)	20(S)	30(S)	9,22±0,07 A	9,12±0.05 A	8,91±0,02 B
1.2	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	40(S)	45(S)	0(R)	33(S)	0 (R)	20(S)	32(S)	9,02±0,02 A	8,55±0,07 B	8,45±0,15 B
1.6	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	30(S)	33(S)	0(R)	30(S)	0(R)	20(S)	30(S)	9,61±0,02 A	8,74±0,04 B	8,50±0.17 B
1.9	*L. rhamnosus*	MT318649.1	100	+	-	35(S)	30(S)	0(R)	30(S)	0(R)	21(S)	30(S)	8,74±0,04 A	8,90±0,11 A	8,00±0 .00B
1.10	*L. rhamnosus*	MT645513.1	100	+	-	35(S)	35(S)	10(R)	35(S)	0(R)	25(S)	30(S)	9,09±0,08 A	8,41±0,09 B	8,10±0,17 B
1.16	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	35(S)	35(S)	0(R)	35(S)	0(R)	22(S)	30(S)	9.64±0.04 A	9,24±0,07 B	9,08±0,08 B
1.23	*E. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	39(S)	0(R)	0(R)	13(R)	24(S)	24(S)	31(S)	9.65±0.03 A	8,47±0,0B	8,30±0,17 B
1.27	*E. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	37(S)	0(R)	0(R)	10(R)	24(S)	25(S)	29(S)	9.09±0.04 A	8,41±0,09 B	8,35±0,09 B
1.29	*E. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	39(S)	0(R)	0(R)	8(R)	21(S)	25(S)	20(S)	8.71±0.12 A	8,00±0,00 A	8,68±0,13 B
1.30	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	37(S)	35(S)	10(R)	20(S)	0(R)	25(S)	20(S)	9.26±0.06 A	8,90±0,00 B	8,68±0,08 C
1.36	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	32(S)	21(S)	0(R)	15(I)	0(R)	20(S)	17(I)	9.02±0.04 A	8,88±0,03 B	8,00±0,00 C
1.41	S. salivarius	MT611793.1	100	+	-	37(S)	31(S)	20(S)	40(S)	25(S)	30(S)	39(S)	9.01±0.02 A	8,30±0,00 B	8,30±0,00 B
1.71	*E. faecium*	KX242443.1	100	+	-	37(S)	40(S)	8(R)	9(R)	28(S)	22(S)	29(S)	9,23±0,01 A	8,74±0,04 B	9,17±0,00 A
1.72	*E. hirae*	CP055231.1	98,9	+	-	30(S)	27(S)	0(R)	15(I)	21(S)	23(S)	29(S)	9,25±0,05 A	8,00±0,00 B	8,00±0,00 B

L: *Lactobacillus*; E: *Enterococcus*; S: *Streptococcus*; Id.. Identidade; Cat. Catalase; S:Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AMP: Ampicilina 10µg; ERI: Eritromicina 10µg; EST; Estreptomicina 10µg; TET: Tetraciclina 30µg; VAN; Vancomicina 30µg; CIP: Ciprofloxacina 5µg; CLO: Cloranfenicol 30µg; SSF: Fluído Simulado Salivar; SSG: Fluído Simulado Gástrico; SSI: Fluído simulado Intestinal; CFU:Unidade Formadora de Colónias; A/B: Médias que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes.

Tabela 4. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas isoladas da microbiota intestinal do indivíduo 2.

N°	Cepa	N° acesso Genbank	Id. (%)	Gram	Cat.	Sensibilidade antimicrobiana(mm)							Digestibilidade Gastrointestinal log10 UFC/mL		
						AMP	ERI	EST	TET	VAN	CIP	CLO	SSF	SGF	SIF
2.4	*E.. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	30(S)	0(R)	0(R)	0(R)	20(S)	20(S)	25(S)	9,00±0,03A	8,41±0.09B	8,35±0,09B
2.8	*E. faecium*	MT597585.1	100	+	-	33(S)	25(S)	0(R)	34(S)	20(S)	19(I)	25(S)	8,74±0.04A	8,00±0.00B	8,71±0,04A
2.12	*E. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	32(S)	0(R)	0(R)	9(R)	15(I)	20(S)	28(S)	9.11±0.10A	8,47±0,00B	8,47±0,00 B
2.13	*E. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	30(S)	0(R)	0(R)	8(R)	20(S)	20(S)	27(S)	8.77±0.00A	8,00±0.00C	8,30±0,00B
2.14	*E. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	32(S)	14(R)	0(R)	14(R)	20(S)	24(S)	29(S)	9.07±0.03A	8,30±0.00B	8,00±0,00C
2.18	*E. faecium*	KF149258.1	98,8	+	-	30(S)	25(S)	0(R)	20(S)	21(S)	17(I)	16(I)	8.66±0.05A	8,20±0,17B	8,00±0,00B
2.23	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	36(S)	35(S)	0(R)	35(S)	5(R)	21(S)	30(S)	9.35±0.04A	8,61±0.12B	8,35±0,09C
2.24	*E. hirae*	CP055232.1	100	+	-	30(S)	27(S)	0(R)	16(I)	23(S)	25(S)	27(S)	9,17±0,11A	8,63±0,20B	8,84±0,00C
2.25	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	45(S)	35(S)	0(R)	40(S)	8(R)	25(S)	35(S)	9,28±0,01A	9,29±0,03A	9,01±0,00B
2.26	*E. faecium*	MH385356.1	99,2	+	-	30(S)	0(R)	0(R)	19(I)	21(S)	17(I)	16(I)	8,64±0,15A	8,64±0,15A	8,95±0,00A
2.28	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	38(S)	45(S)	7(R)	35(S)	0(R)	24(S)	30(S)	9,46±0,03A	9,36±0,02A	8,61±0,12B
2.32	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	36(S)	35(S)	0(R)	38(S)	0(R)	21(S)	34(S)	9,28±0,01A	8,50±0,02A	8,50±0,17B
2.37	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	39(S)	30(S)	14(R)	35(S)	0(R)	22(S)	32(S)	9,38±0,01A	9,23±0,05B	9,18±0,05B
2.39	*E. faecium*	MH385356.1	98,5	+	-	35(S)	0(R)	10(R)	20(S)	23(S)	20(S)	15(I)	9,02±0,02A	8,65±0,09B	8,89±0,10A

L: *Lactobacillus*; E: *Enterococcus*; S: *Streptococcus*; Id.. Identidade; Cat. Catalase; S:Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AMP: Ampicilina 10µg; ERI: Eritromicina 10µg; EST; Estreptomicina 10µg; TET: Tetraciclina 30µg; VAN; Vancomicina 30µg; CIP: Ciprofloxacina 5µg; CLO: Cloranfenicol 30µg; SSF: Fluído Simulado Salivar; SSG: Fluído Simulado Gástrico; SSI: Fluído simulado Intestinal; CFU:Unidade Formadora de Colónias; A/B: Médias que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes.

Tabela 5. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas isoladas da microbiota intestinal do indivíduo 3.

N°	Cepa bacteriana	N° acesso Genbank	Ident. (%)	Gram	Cat.	Sensibilidade antimicrobiana (mm)							Digestibilidade Gastrointestinal log10 UFC/mL		
						AMP	ERI	EST	TET	VAN	CIP	CLO	SSF	SGF	SIF
3.6	*E. avium*	MT604783.1	100	+	-	40(S)	36(S)	0(R)	40(S)	28(S)	23(S)	25(S)	9,29±0,01A	8,00±0,00B	8,00±0,00B
3.9	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	45(S)	40(S)	0(R)	25(S)	0(R)	20(S)	45(S)	9,20±0,00A	9,04±0,00A	8,79±0,14B
3.10	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	45(S)	40(S)	0(R)	36(S)	9(R)	20(S)	35(S)	9,36±0,09A	8,98±0,04B	8,66±0,16 C
3.19	*L.paracasei*	MW116681.1	100	+	-	42(S)	43(S)	9(R)	40(S)	8(R)	21(S)	40(S)	9,13±0,09A	8,00±0,00B	8,00±0,00B
3.21	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	45(S)	45(S)	0(R)	40(S)	8(R)	21(S)	40(S)	9,20±0,02A	8,38±0,09B	8,00±0,00C
3.42	*E.gallinarium*	MK005265.1	100	+	-	36(S)	35(S)	13(R)	35(S)	21(S)	25(S)	32(S)	8,96±0,02A	8,00±0,00B	8,61±0,10C
3.55	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	46(S)	40(S)	0(R)	35(S)	12(R)	20(S)	35(S)	8,44±0,13A	8,85±0,12A	8,75±0,04A
3.61	*L. paracasei*	MW116681.1	100	+	-	41(S)	45(S)	0(R)	29(S)	9(R)	20(S)	39(S)	8,85±0,13A	8,84±0,12B	8,75±0,04A
3.96	*E. avium*	MT604783.1	100	+	-	48(S)	29(S)	0(R)	22(S)	31(S)	22(S)	40(S)	9,46±0,04A	8,07±0,15B	8,00±0,00B
3.107	*E.faecium*	MT597585.1	100	+	-	27(S)	14(R)	9(R)	17(I)	24(S)	22(S)	25(S)	8,92±0,05A	8,52±0,11B	8,50±0,06B
3.124	*E. faecium*	MT597585.1	100	+	-	29(S)	14(R)	13(R)	18(I)	22(S)	20(S)	25(S)	9,24±0,02A	8,56±0,06B	9,14±0,06A
3.126	*E. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	30(S)	25(S)	0(R)	22(S)	19(I)	20(S)	26(S)	9.04±0.08A	8,22±0,15B	8,54±0,15C

L: *Lactobacillus*; E: *Enterococcus*; S: *Streptococcus*; Id.. Identidade; Cat. Catalase; S:Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AMP: Ampicilina 10µg; ERI: Eritromicina 10µg; EST; Estreptomicina 10µg; TET: Tetraciclina 30µg; VAN; Vancomicina 30µg; CIP: Ciprofloxacina 5µg; CLO: Cloranfenicol 30µg; SSF: Fluído Simulado Salivar; SSG: Fluído Simulado Gástrico; SSI: Fluído simulado Intestinal; CFU:Unidade Formadora de Colónias; A/B: Médias que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes.

Tabela 6. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas isoladas da microbiota intestinal do indivíduo 4.

N°	Cepa	N° acesso Genbank	Id. (%)	Gram	Cat.	Sensibilidade antimicrobiana							Digestibilidade Gastrointestinal log10 UFC/mL		
						AMP	ERI	EST	TET	VAN	CIP	CLO	SSF	SGF	SIF
4.21	*E.. faecium*	KX242443.1	98,94	+	-	45(S)	29(S)	19(I)	40(S)	32(S)	33(S)	45(S)	8,47±0,00A	8.00±0.00B	8,00±0,00C
4.27	*S. salivarius*	MT611793.1	100	+	-	36(S)	33(S)	0(R)	35(S)	23(S)	23(S)	35(S)	8,47±0,08A	8,00±0,00B	8,20±0,17B
4.29	*E. faecalis*	MT611694.1	100	+	-	37(S)	30(S)	0(R)	36(S)	21(S)	22(S)	30(S)	9,00±0,00A	8,42±0,08B	8,00±0,00C
4.46	*E. hirae*	CP055229.1	99.74	+	-	40(S)	35(S)	0(R)	35(S)	29(S)	21(S)	30(S)	9,03±0,02A	8,61±0,22B	8,38±0,09 B
8.84±0.00C 4.52	*E. hirae*	CP055232.1	99.74	+	-	35(S)	32(S)	0(R)	35(S)	28(S)	15 (I)	34(S)	9,00±0,00A	8,55±0,05B	8,35±0,09C
4.59	*E. faecium*	MT114923.1	100	+	-	34(S)	33(S)	0(R)	33(S)	26(S)	20(S)	30(S)	9,02±0,02A	8,00±0,00B	8,90±0,00C
4.60	*E. faecium*	MT634243.1	99.79	+	-	36(S)	35(S)	9(R)	39(S)	26(S)	25(S)	34(S)	9,28±0,01A	8,61±0,15B	9,15±0.06A
4.72	*E. faecium*	MF369871.1	98,80	+	-	35(S)	33(S)	15(I)	30(S)	20(S)	25(I)	27(I)	9,01±0,02A	8,97±0,11A	8,95±0,05A
4.89	*L*. lactis*	MT604792.1	100	+	-	37(S)	28(S)	0(R)	36(S)	22(S)	19(S)	30(S)	9.47±0.01A	8,00±0,00B	8,9±0,08C

L: *Lactobacillus*; E: *Enterococcus*; S: *Streptococcus*; Id.. Identidade; Cat. Catalase; S:Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AMP: Ampicilina 10µg; ERI: Eritromicina 10µg; EST; Estreptomicina 10µg; TET: Tetraciclina 30µg; VAN; Vancomicina 30µg; CIP: Ciprofloxacina 5µg; CLO: Cloranfenicol 30µg; SSF: Fluído Simulado Salivar; SSG: Fluído Simulado Gástrico; SSI: Fluído simulado Intestinal; CFU:Unidade Formadora de Colónias; A/B: Médias que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes. diferente.

Tabela 7. Identificação e caracterização das cepas potencialmente probióticas isoladas da microbiota intestinal do indivíduo 5.

N°	Cepa	N° acesso Genbank	id. (%)	Gram	Cat.	Sensibilidade antimicrobiana (mm)							Digestibilidade Gastrointestinal log10 UFC/mL		
						AMP	ERI	EST	TET	VAN	CIP	CLO	SSF	SGF	SIF
5.27	*L. lactis*	MT604792.1	100	+	-	39(S)	31(S)	15(I)	27(S)	0(R)	23(S)	26(S)	9,24±0,00A	8,41±0,09C	8,00±0,00B
5.29	*L. lactis*	MT604792.1	100	+	-	36(S)	36(S)	19(I)	30(S)	0(R)	21(S)	30(S)	9,25±0,05A	8,10±0,17B	8,30±0,00B
5.32	*L. lactis*	MT604792.1	100	+	-	38(S)	30(S)	18(I)	30(S)	0(R)	26(S)	30(S)	8,35±0,09A	8,00±0,00B	8,75±0,15 C
5.33	*L.lactis*	MT604792.1	100	+	-	33(S)	29(S)	16(I)	29(S)	0(R)	24(S)	26(S)	9,20±0,03A	8,47±0,00B	8,47±0,00B
5.59	*L. lactis*	MT604792.1	100	+	-	35(S)	29(S)	19(I)	27(S)	0(R)	22(S)	25(S)	9,15±0,10A	9,02±0,02A	8,75±0,15B
5.76	*L. lactis*	MT604792.1	100	+	-	34(S)	30(S)	15(I)	28(S)	0(R)	21(S)	20(S)	8,30±0,00A	8,00±0,00B	8,00±0,00B
5.85	*L. lactis*	MT604792.1	100	+	-	35(S)	30(S)	16(I)	30(S)	0(R)	24(S)	29(S)	8,60±0,00A	8,47±0,00B	8,81±0,07C
5.105	*W. confusa*	MT613585.1	100	+	-	35(S)	30(S)	0(R)	35(S)	0(R)	21(S)	30(S)	9,32±0,00A	9,19±0,00B	8,47±0,00C
5. 106	*W. confusa*	MT613585.1	100	+	-	45(S)	40(S)	0(R)	40(S)	0(R)	20(S)	25(S)	9,37±0,04A	9,11±0,04B	9,37±0,01A
5.109	*W. confusa*	MT613585.1	100	+	-	30(S)	31(S)	1(R)	25(S)	0(R)	28(S)	26(S)	9,28±0,05A	8,95±0,05B	8,50±0,06B
5.112	*W. confusa*	MT613585.1	100	+	-	32(S)	30(S)	1(R)	27(S)	0(R)	20(S)	27(S)	9,29±0,01A	8,30±0,00B	8,00±0,00C
5.119	*W. confusa*	MT613585.1	100	+	-	33(S)	31(S)	1(R)	26(S)	0(R)	20(S)	25(S)	8,20±0,17A	8,20±0,17B	8,10±0,17B

L: *Leuconostoc*;*W: Weisiella*; Id. Identidade; Cat. Catalase; S:Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AMP: Ampicilina 10µg; ERI: Eritromicina 10µg; EST; Estreptomicina 10µg; TET: Tetraciclina 30µg; VAN; Vancomicina 30µg; CIP: Ciprofloxacina 5µg; CLO: Cloranfenicol 30µg. Todos os valores da análise antimicrobiana foram expressos em milímetros (mm). SSF: Fluído Simulado Salivar; SSG: Fluído Simulado Gástrico; SSI: Fluído simulado Intestinal. CFU: Unidade Formadora de Colónias; A/B: Médias que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes.

Sobrevivência em condições que simulam o trato gastrointestinal humano

A habilidade de sobreviver nas condições adversas do trato gastrointestinal humano (baixo pH, presença de enzimas pepsina, pancreatina e tolerância aos sais biliares) é um requisito importante para um microrganismo ser considerado probiótico [82], pois a cepa precisa exercer seus efeitos benéficos sistêmicos no colón. Todas as cepas isoladas mostraram - se altamente resistentes às condições simuladas do trato gastrointestinal, com redução máxima 1,4 $\log_{10}$ UFC / mL após exposição aos fluidos salivar, gástrico e intestinal, com população final entre 9 e 8 $\log_{10}$ UFC / mL (Tabelas 3 a 7).

Sensibilidade antimicrobiana

Para determinar os padrões de sensibilidade antimicrobiana das cepas já selecionas para cada indivíduo, foi usado o ensaio de difusão em discos utilizando sete antibióticos, de acordo com o CLSI. Todas as cepas foram submetidas a ensaios com sete tipos de antibióticos para garantir a segurança

Todas as cepas se mostraram sensíveis a ampicilina (10µg), cloranfenicol (30µg) e ciprofloxacina (5µg), garantindo a segurança de uso e possibilidade de eliminação do organismo do hospedeiro, caso seja verificado algum efeito indesejável ou translocação.

Como esperado, algumas cepas exibiram resistência a antibióticos específicos. As cepas de *Lactobacillus* spp. foram resistentes aos antibióticos estreptomicina (10µg) e vancomicina (30µg), resultados semelhantes aos relatados na literatura [83]. *Lactobacillus* spp. são geralmente resistentes aos aminoglicosídeos (estreptomicina) e essa resistência deve-se à baixa permeabilidade da superfície das células a esses antibióticos, resistência essa considerada intrínseca [83, 84]. A alta resistência natural de cepas de *Lactobacillus* spp. à vancomicina (glicopeptidico) também já é conhecida, porém a suscetibilidade a esses antibióticos mostrou ser dependente da espécie [83, 85]. Todas as cepas de *Enterococcus* spp. se mostraram resistentes a estreptomicina (10µg), enquanto 77,8 % das cepas da espécie *E. faecalis* foram resistentes a eritromicina (15µg) e tetraciclina (30µg) e apenas uma cepa da espécie *E. faecium* se

mostrou resistente a eritromicina (15µg). A resistência desse gênero para estreptomicina, eritromicina e tetraciclina já é bem conhecida e demostrada em estudos anteriores. Para os aminoglicosídeos essa resistência é considerada intrínseca já para eritromicina e tetraciclina é considerada adquirida e pode ser transferida através de plasmídeos para outros microrganismos [86–88]. As espécies *L. lactis* e *S. salivarius* se mostraram sensíveis a todos os antibióticos testados neste estudo e a espécie *W. confusa* mostrou resistência somente a estreptomicina, resultado esse já demostrado em estudos anteriores [89, 90].

“Banco de Microbiota”

Após a identificação e caracterização de cada cepa foi criado um banco com as células bacterianas individuais para cada criança, seguindo as especificações do guia criado pela ATCC e *Thermo Fisher Scientific*. Todas as células foram preservadas em seus meios específicos com adição 10% de glicerol e preservadas em freezer a -80°C, localizados no Laboratório de Pesquisa em Probióticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Para auxiliar na manutenção da estabilidade genética das células cultivadas foi criado um sistema de lote de sementes. Ao preparar o primeiro lote congelado de uma cultura, uma parte do lote foi reservada como material de semente e esses frascos foram mantidos separados dos estoques de trabalho, garantido assim que não sejam manipulados durante a recuperação**.**

Conclusão

O presente estudo demostrou a viabilidade da criação de bancos de células microbianas potencialmente probióticas individualizados, a partir de amostras de fezes de crianças saudáveis, utilizando uma combinação de técnicas de microbiologia convencional e biologia molecular. Essa estratégia é inovadora, pois ao contrário das atualmente utilizadas, não possui efeito adverso e respeita a individualidade do microbioma humano a medida em que propõe o uso de células isoladas do próprio paciente para repor a MI e tratar doenças que estejam relacionadas à disbiose.

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

[2] Thomas S, Izard J, Walsh E, et al. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Res* 2017; 77: 1783–1812.

[3] Polanco Allué I. Microbiota and Gastrointestinal Diseases. *An Pediatr* 2015; 83: 443.e1-443.e5.

[4] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Human Gut Microbes Associated with Obesity. *Nature* 2006; 444: 1022–1023.

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

[6] 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.

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

[8] 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.

[9] 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.

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

[11] Xu M-Q. Fecal Microbiota Transplantation Broadening its Application Beyond Intestinal Disorders. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 102.

[12] 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.

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

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

[15] Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, et al. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell* 2018; 174: 1406-1423.e16.

[16] Do VT, Baird BG, Kockler DR. Probiotics for Maintaining Remission of Ulcerative Colitis in Adults. *Ann Pharmacother* 2010; 44: 565–571.

[17] Szajewska H, Horvath A, Kołodziej M. Systematic Review with Meta-Analysis: *Saccharomyces boulardii* supplementation and eradication of *Helicobacter pylori* Infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 41: 1237–1245.

[18] Shen J, Zuo Z-X, Mao A-P. Effect of Probiotics on Inducing Remission and Maintaining Therapy in Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, and Pouchitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20: 21–35.

[19] Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, et al. Bilateral Prophylactic Mastectomy Reduces Breast Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: The PROSE Study Group. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1055–1062.

[20] Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693–1703.

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

Probiotics from Athlete Microbiomes. In: *Proceedings of Probiota America*. Miami,EUA, https://www.probiotaamericas.com/wp-content/uploads/2018/06/Probiota-Americas-2018-ONSITE-PROGRAM.pdf. (2018).

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

[23] 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.

[24] 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.

[25] Saúde CN de. RESOLUÇÃO CNS Nº 441. Brasil, http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf (2011).

[26] Alimolaei M, Golchin M. An Efficient DNA Extraction Method for *Lactobacillus casei*, a Difficult-to-Lyse Bacterium. *Int J Enteric Pathog* 2016; 4: e32472.

[27] Maleki Kakelar H, Barzegari A, Hanifian S, et al. Isolation and Molecular Identification of *Lactobacillus* with Probiotic Potential from Abomasums Driven Rennet. *Food Chem* 2019; 272: 709–714.

[28] Pelczar M., Chan EC., Krieg N. *Microbiology Concepts and Applications*. New York,EUA: Tata McGraw-Hill, 1993.

[29] Heilig HGHJ, Zoetendal EG, Vaughan EE, et al. Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 114–123.

[30] Liu W, Chen M, Duo L, et al. Characterization of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria isolated from Human Colostrum. *J Dairy Sci* 2020; 103: 4013–4025.

[31] Minekus M, Alminger M, Alvito P, et al. A standardised Static in Vitro Digestion Method Suitable for Food – an International Consensus. *Food Funct* 2014; 5: 1113–1124.

[32] NCCLS.CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standardsfor Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. EUA, 2003.

[33] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. USA, 2020.

[34] Simione FP. Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide.

[35] Ehrmann MA, Müller MRA, Vogel RF. Molecular Analysis of Sourdough Reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 7–13.

[36] Hayford AE, Petersen A, Vogensen FK, et al. Use of Conserved Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fragments and RAPD Pattern for Characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian Fermented Maize Dough. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3213–3221.

[37] De Vuyst L, Schrijvers V, Paramithiotis S, et al. The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs Is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 6059–6069.

[38] Atienzar FA, Jha AN. The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay and Related Techniques Applied to Genotoxicity and Carcinogenesis Studies: A critical review. *Mutat Res Mutat Res* 2006; 613: 76–102.

[39] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7213–7218.

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

[41] Towner K, Grundmann H. Generation and Analysis of RAPD Fingerprinting Profiles. In: Dijkshoorn L, Towner KJ, Struelens M (eds) *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*. Elsevier, 2001, pp. 135–157.

[42] Cobb BD, CIarkson JM. A Simple Procedure for Optimising the Polymerase Chain Reaction (PCR) Using Modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3801–3805.

[43] Benter T, Papadopoulos S, Pape M, et al. Optimization and Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA in Human. *Anal Biochem* 1995; 230: 92–100.

[44] Atienzar F, Evenden A, Jha A, et al. Optimized RAPD Analysis Generates High-Quality Genomic DNA Profiles at High Annealing Temperature. *Biotechniques*. Epub ahead of print 2000. DOI: 10.2144/00281bm09.

[45] Salvetti E, Torriani S, Felis GE. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob Proteins*. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1007/s12602-012-9117-8.

[46] Lee J-H, O'Sullivan DJ. Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1128/mmbr.00004-10.

[47] Mazurier S-I, Wernars K. Typing of *Listeria* Strains by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Res Microbiol* 1992; 143: 499–505.

[48] Araújo WL, Angellis DA de, Azevedo JL. Direct RAPD Evaluation of Bacteria without Conventional DNA Extraction. *Brazilian Arch Biol Technol* 2004; 47: 375–380.

[49] Sakallah SA, Lanning RW, Cooper DL. DNA Fingerprinting of Crude Bacterial Lysates Using Degenerate RAPD Primers. *Genome Res* 1995; 4: 265–268.

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

[51] Moradi M, Molaei R, Guimarães JT. A Review on Preparation and Chemical Analysis of Postbiotics from Lactic Acid Bacteria. *Enzyme Microb Technol* 2021; 143: 109722.

[52] Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al. A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020; 70: 2782–2858.

[53] Fijan S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11: 4745–4767.

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

[55] Odamaki T, Kato K, Sugahara H, et al. Age-Related Changes in Gut Microbiota Composition from Newborn to Centenarian: A Cross-Sectional Study. *BMC Microbiol* 2016; 16: 90.

[56] Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (80-)* 2005; 308: 1635–1638.

[57] Tulumoglu S, Yuksekdag ZN, Beyatli Y, et al. Probiotic Properties of Lactobacilli species Isolated from Children's Feces. *Anaerobe* 2013; 24: 36–42.

[58] Kook S-Y, Chung E-C, Lee Y, et al. Isolation and Characterization of Five Novel Probiotic Strains from Korean Infant and Children Faeces. *PLoS One* 2019; 14: e0223913.

[59] Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clin Infect Dis* 2015; 60: S98–S107.

[60] Kim W-K, Jang YJ, Seo B, et al. Administration of *Lactobacillus paracasei* Strains Improves Immunomodulation and Changes the Composition of Gut Microbiota Leading to Improvement of Colitis in Mice. *J Funct Foods* 2019; 52: 565–575.

[61] Håkansson Å, Andrén Aronsson C, Brundin C, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* on the Peripheral Immune Response in Children with Celiac Disease Autoimmunity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients* 2019; 11: 1925.

[62] Han DH, Kim W-K, Park S, et al. *Lactobacillus paracasei* Treatment Modulates mRNA Expression in Macrophages. *Biochem Biophys Reports* 2020; 23: 100788.

[63] Silva M, Jacobus N V., Deneke C, et al. Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* Strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1231–1233.

[64] Falcinelli S, Picchietti S, Rodiles A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* Lowers Zebrafish Lipid Content by Changing Gut Microbiota and Host Transcription of Genes Involved in Lipid Metabolism. *Sci Rep* 2015; 5: 9336.

[65] Ganguli K, Collado MC, Rautava J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG and its SpaC Pilus Adhesin Modulate Inflammatory Responsiveness and TLR-related Gene Expression in the Fetal Human Gut. *Pediatr Res* 2015; 77: 528–535.

[66] Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, et al. *Lactobacillus* GG Administered in Oral Rehydration Solution to Children with Acute Diarrhea: A Multicenter European Trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 54–60.

[67] Ruoff KL. Recent Taxonomic Changes in the Genus *Enterococcu*s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 75–79.

[68] Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, et al. Enterococci as Probiotics and their Implications in Food Safety. *Int J Food Microbiol* 2011; 151: 125–140.

[69] Kim J-Y, Awji EG, Park N-H, et al. Probiotic Properties and Adsorption of *Enterococcus faecalis* PSCT3-7 to Vermiculite. *J Vet Sci* 2017; 18: 95.

[70] Wei M, Gu E, Luo J, et al. *Enterococcus hirae* WEHI01 Isolated from a Healthy Chinese Infant Ameliorates the Symptoms of type 2 Diabetes by Elevating the Abundance of Lactobacillales in Rats. *J Dairy Sci* 2020; 103: 2969–2981.

[71] Mignolet J, Fontaine L, Sass A, et al. Circuitry Rewiring Directly Couples Competence to Predation in the Gut Dweller *Streptococcus salivarius*. *Cell Rep* 2018; 22: 1627–1638.

[72] Dodoo CC, Stapleton P, Basit AW, et al. The Potential of *Streptococcus salivarius* Oral Films in the Management of Dental Caries: An Inkjet Printing Approach. *Int J Pharm* 2020; 591: 119962.

[73] Cupi D, Elvig-Jørgensen SG. Safety Assessment of *Weissella confusa* – A Direct-Fed Microbial Candidate. *Regul Toxicol Pharmacol* 2019; 107: 104414.

[74] Sturino JM. Literature-Based Bafety Assessment of an Agriculture- and Animal-Associated Microorganism: *Weissella confusa*. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018; 95: 142–152.

[75] Steinkraus KH. Fermentations in World Food Processing. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2002; 1: 23–32.

[76] Vedamuthu ER. The Dairy Leuconostoc: Use in Dairy Products. *J Dairy Sci* 1994; 77: 2725–2737.

[77] Nomoto R, Takano S, Tanaka K, et al. Isolation and Identification of *Bifidobacterium* Species from Seces of Captive Chimpanzees. *Biosci Microbiota, Food Heal* 2017; 36: 91–99.

[78] Vlková E, Rada V, Bujňáková D, et al. Enumeration, Isolation, and Identification of Bifidobacteria from Infant Feces. *Folia Microbiol (Praha)* 2004; 49: 209–212.

[79] Chung H., Kim Y., Chun S., et al. Screening and Selection of Acid and Bile Resistant Bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 1999; 47: 25–32.

[80] Jolivet-Gougeon A, David-Jobert S, Tamanai-Shacoori Z, et al. Osmotic Stress-Induced Genetic Rearrangements in *Escherichia coli* H10407 Detected by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 5484–5487.

[81] Lanzone V, Tofalo R, Fasoli G, et al. Food Borne Bacterial Models for Detection of Benzo[a] Pyrene DNA Adducts Formation Using RAPD PCR. *Microb Biotechnol* 2016; 9: 400–407.

[82] 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.

[83] Anisimova EA, Yarullina DR. Antibiotic Resistance of Lactobacillus Strains. *Curr Microbiol* 2019; 76: 1407–1416.

[84] Kirtzalidou E, Pramateftaki P, Kotsou M, et al. Screening for lactobacilli with Probiotic Properties in the Infant Gut Microbiota. *Anaerobe* 2011; 17: 440–443.

[85] Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to Antimicrobial Agents. *Int J Food Microbiol* 2003; 82: 1–11.

[86] Citak S, Yucel N, Orhan S. Antibiotic Resistance and Incidence of *Enterococcus* Species in Turkish White Cheese. *Int J Dairy Technol* 2004; 57: 27–31.

[87] Özmen Toğay S, Çelebi Keskin A, Açık L, et al. Virulence Genes, Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Naturally Fermented Turkish foods. *J Appl Microbiol* 2010; 109: 1084–1092.

[88] Amaral DMF, Silva LF, Casarotti SN, et al. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* Isolated from Cheese: Survival in the Presence of Medications Under Simulated Gastrointestinal Conditions and Adhesion Properties. *J Dairy Sci* 2017; 100: 933–949.

[89] Yu H-S, Jang HJ, Lee N-K, et al. Evaluation of the Probiotic Characteristics and Prophylactic Potential of *Weissella cibaria* Strains Isolated from Kimchi. *LWT* 2019; 112: 108229.

[90] Jeong D-W, Lee J-H. Antibiotic Resistance, Hemolysis and Biogenic Amine Production Assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* Isolates for Kimchi starter development. *LWT - Food Sci Technol* 2015; 64: 1078–1084.

Apêndice 1- Termo de aprovação do comitê de ética



PARECER DO RELATOR (Provisório)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada

Pesquisador: Eliane Vale da Silva
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 14569519.4.0000.5426
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 3.374.343
Data prevista para a reunião do Colegiado: 27/06/2019

Apresentação do Projeto:
O objetivo do estudo é otimizar a seleção de cepas potencialmente probióticas (principalmente Lactobacillus spp. e Bifidobacterium spp.) e construir um "banco de células individualizado" para serem utilizadas em terapia personalizada de doenças relacionadas à disbiose. As cepas serão selecionadas de material fecal de 5 crianças com idades entre dois e seis anos de idade. Posteriormente será realizada a caracterização (RAPD PCR, coloração de Gram, teste de resistência gastrointestinal e suscetibilidade a antibióticos) das cepas selecionadas e as mesmas serão armazenadas à -80°C. A composição da microbiota fecal de cada criança será determinada por sequencimento (Illumina Miseq) e os dados serão analisados e agrupados segundo a taxonomia e a diversidade intra e entre amostras, utilizando a base de dados Greengenes.

Objetivo da Pesquisa:
O objetivo do estudo é otimizar a seleção de cepas potencialmente probióticas (principalmente Lactobacillus spp. e Bifidobacterium spp.) e construir um "banco de células individualizado" para serem utilizadas em terapia personalizada de doenças relacionadas à disbiose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Os riscos são mínimos, podendo levar apenas a algum constrangimento e desconforto no

momento da coleta das fezes.

Com relação aos benefícios os pesquisadores relatam que com o estudo poderá ser ampliado o conhecimento sobre a microbiota infantil, além de propiciar a construção de um "banco de células individualizado" para ser utilizado em terapia personalizada de doenças relacionadas à disbiose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado e a proposta bem apresentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequadamente apresentado e é solicitada dispensa do Termo de Assentimento com a justificativa de que as crianças participantes (2 a 6 anos) não possuem autonomia e maturidade suficientes para compreensão do estudo e para assentir sua participação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se adequado para aprovação do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1322921.pdf	27/05/2019 13:52:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_.doc	27/05/2019 13:51:32	Eliane Vale da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo_doacao_materialbiologico.doc	27/05/2019 13:47:56	Eliane Vale da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	24/05/2019 12:01:30	Eliane Vale da Silva	Aceito
Outros	dispensa.pdf	24/05/2019 12:01:00	Eliane Vale da Silva	Aceito
Folha de Rosto	BRN3C2AF43EE185_001450.pdf	15/04/2019 10:58:13	Eliane Vale da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Apêndice 2 - Termo de assentimento livre e esclarecido

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu Eliane Vale da silva, responsável pela pesquisa intitulada "**Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada**", declaro que foi informado com linguagem simples e adequada à criança mostrando imagens e falando sobre sua participação nesta pesquisa da seguinte forma:

"Olá _____você é muito importante para nós e por isso estou te convidando para participar da minha pesquisa, para você poder participar desta pesquisa é necessário que você deixe a mamãe coletar suas fezes três vezes em período de 40 dias (Figura 1),colocar em um potinho(Figura 2) e doar suas fezes, para eu poder levar para o laboratório (Figura 3) e separar os bichinhos (MICRORGANISMOS) legais(Figura 4) das suas fezes e ver no microscópio(Figura 5) o que tem nas suas fezes e guardá-las em um refrigerador (Figura 6) para servir como início de estudo para futuros tratamentos de doenças da barriguinha. Mas você tem o direito de não querer participar desta pesquisa ou dela sair a qualquer momento."

Figura 1



https://www.tricae.com.br/guia-tronquilos/

Figura 2



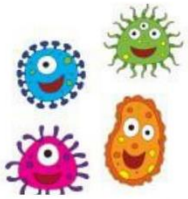
http://labvw.com.br/blog/posso-guardar-a-amostra-para-o-exame-de-fezes-na-geladeira/

Figura 3



https://galeria.colorir.com/profissoes/outras-profissoes/tecnico-de-laboratorio-pintado-por--1201250.html

Figura 4



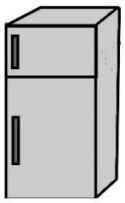
https://www.educatout.com/activites/themes/les-microbes2016.htm

Figura 5



https://gartic.com.br/arquiteta/desenho-jogo/1237670355

Figura 6



https://blog.biologicus.com.br/**bacterias**-benefica-conheca-algumas/

Para qualquer esclarecimento no decorrer da sua participação, estarei disponível através dos telefones: (16) 988278186; (16) 33016932 e e-mail: valeelianevs@gmail.com. O senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, na Rodovia Araraquara Jaú, Km

01 – s/n, Bairro: Campos Ville, 14800-903 – Araraquara, SP, telefone (16) 3301-4657 e e-mail: sta@fcfar.unesp.br.

Eu _____, RG_____, Estado Civil_____, Idade_____ anos, residente na _____, nº_____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____, declaro que após ter sido esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a), lido e assinado o presente termo em duas vias, e entendido tudo o que me foi explicado, concordo em participar da Pesquisa intitulada "**Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada**".

Araraquara, _____ de _____ de 20___.

_____

Assinatura do Responsável

Apêndice 3 – Termo de Consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "**Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada**".

O objetivo deste trabalho é ampliar a seleção de cepas benéficas que habitam o intestino, para serem utilizadas no tratamento de doenças de forma individualizada (terapia personalizada).

Para realizar o estudo será necessário que o(a) Sr.(a) se disponibilize a coletar e doar as amostras de fezes do seu filho (a). As amostras deverão ser coletadas em recipientes estéreis, na quantidade aproximada de 10g (meio pote de coleta) e imediatamente armazenadas sob refrigeração, por um período máximo de 15 horas**.** A coleta será realizada três vezes, em momentos distintos (intercalando uma semana entre as coletas). O material será utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior. Os responsáveis ainda deverão responder a um questionário para caracterização da dieta da criança.

A participação de seu filho(a) como voluntário terá a duração de três meses e não haverá nenhuma despesa ao participar desse estudo, pois todos os materiais necessários para a coleta das amostras serão fornecidos pelo pesquisador responsável.

O risco associado à participação de seu filho (a) na pesquisa é mínimo, uma vez que não serão realizados procedimentos invasivos, não será necessário o uso de medicamentos ou ingestão de suplementos e alterações na dieta da criança. A coleta das fezes, pode levar apenas a algum constrangimento e desconforto para o participante no momento da coleta. Entretanto, caso ocorra algum dano em decorrência de sua participação, o participante fará jus à indenização.

Esta pesquisa auxiliará no desenvolvimento de uma nova forma de tratamento de doenças relacionadas com a população de microrganismos que habitam o intestino humano (microbiota intestinal).

As informações coletadas serão utilizadas unicamente com fins científicos, sendo garantidos o total sigilo e confidencialidade. O(a) Sr.(a) receberá uma cópia desse termo de consentimento livre e esclarecido e, se desejar, será informado sobre os resultados obtidos nessa pesquisa.

O(a) seu(a) filho(a) terá o direito e a liberdade de negar-se a participar desta pesquisa total ou parcialmente ou dela retirar-se a qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo ou punição.

Para qualquer esclarecimento no decorrer da sua participação, estarei disponível através dos telefones: (16) 988278186; (16) 33016932 e e-mail: valeelianevs@gmail.com. O senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, na Rodovia Araraquara Jaú, Km

01 – s/n, Bairro: Campos Ville, 14800-903 – Araraquara, SP, telefone (16) 3301-4657 e e-mail: sta@fcfar.unesp.br.

Eu _____, RG_____, Estado Civil_____, Idade_____ anos, residente na _____, nº_____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____, declaro que após ter sido esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a), lido e assinado o presente termo em duas vias, e entendido tudo o que me foi explicado, concordo em deixar meu filho_____de_____anos à participar da Pesquisa intitulada "**Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada**".

Araraquara, _____ de _____ de 20___.

_____

Assinatura do Pesquisador

_____

Assinatura do Voluntário

Apêndice 4 - Termo de doação de material biológico

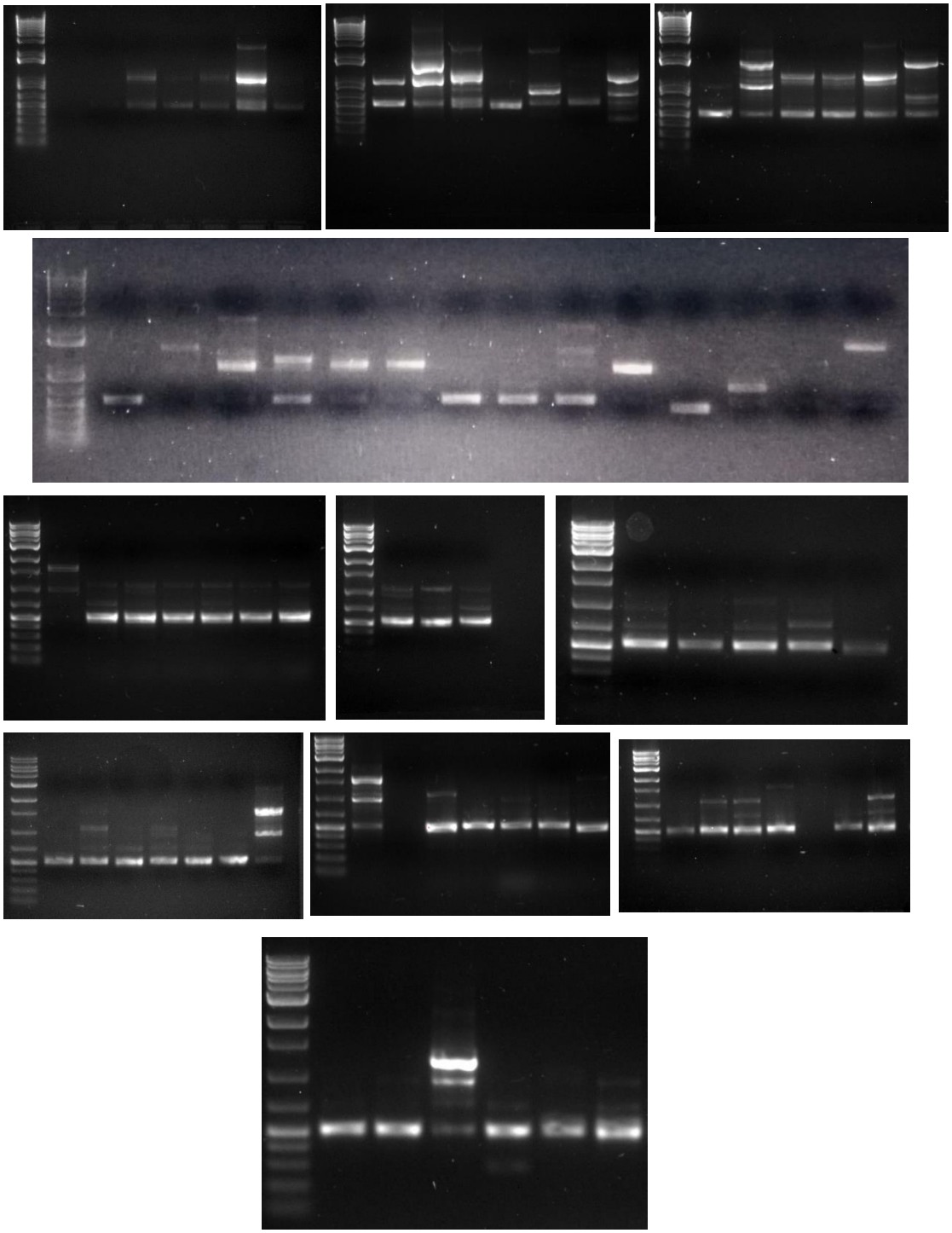
Termo de doação de material biológico

Eu,.....,
RG ....., nacionalidade ....., maior e responsável, estado civil ....., profissão ....., residente....., cidade .....,
Estado ....., no pleno gozo de minhas faculdades mentais e de minha livre e espontânea vontade autorizo ..... a realizar a coleta de amostras de fezes do meu filho(a)....., a qual será doada e utilizada na pesquisa **"Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada",** sob a responsabilidade do(a) .....

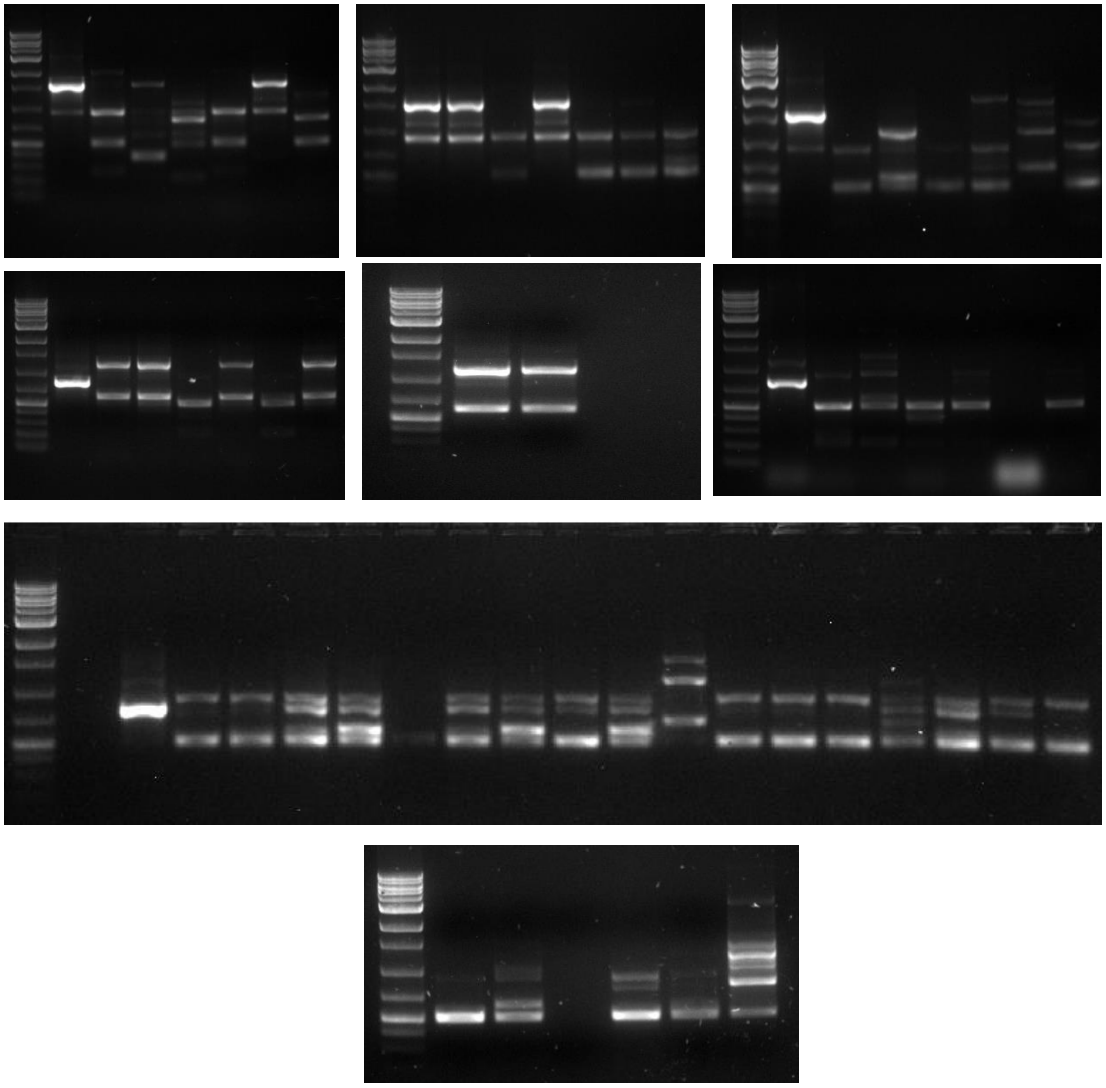
Araraquara, .../..../.....

Apêndice 5 – Imagens RAPD cepas indivíduo 1

Cepas isoladas no meio de cultura MRS

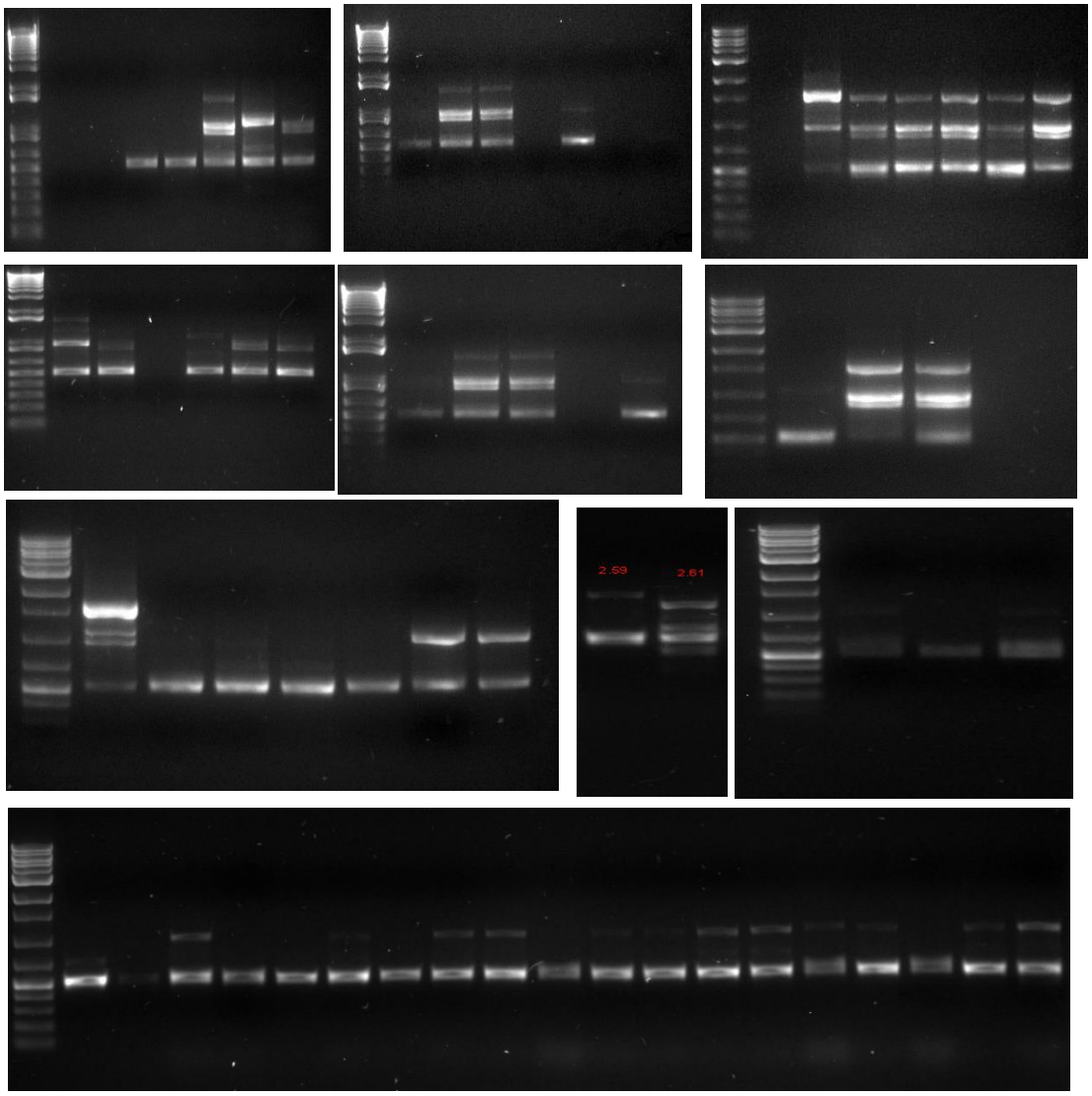


Cepas isoladas no meio de cultura BIM-25

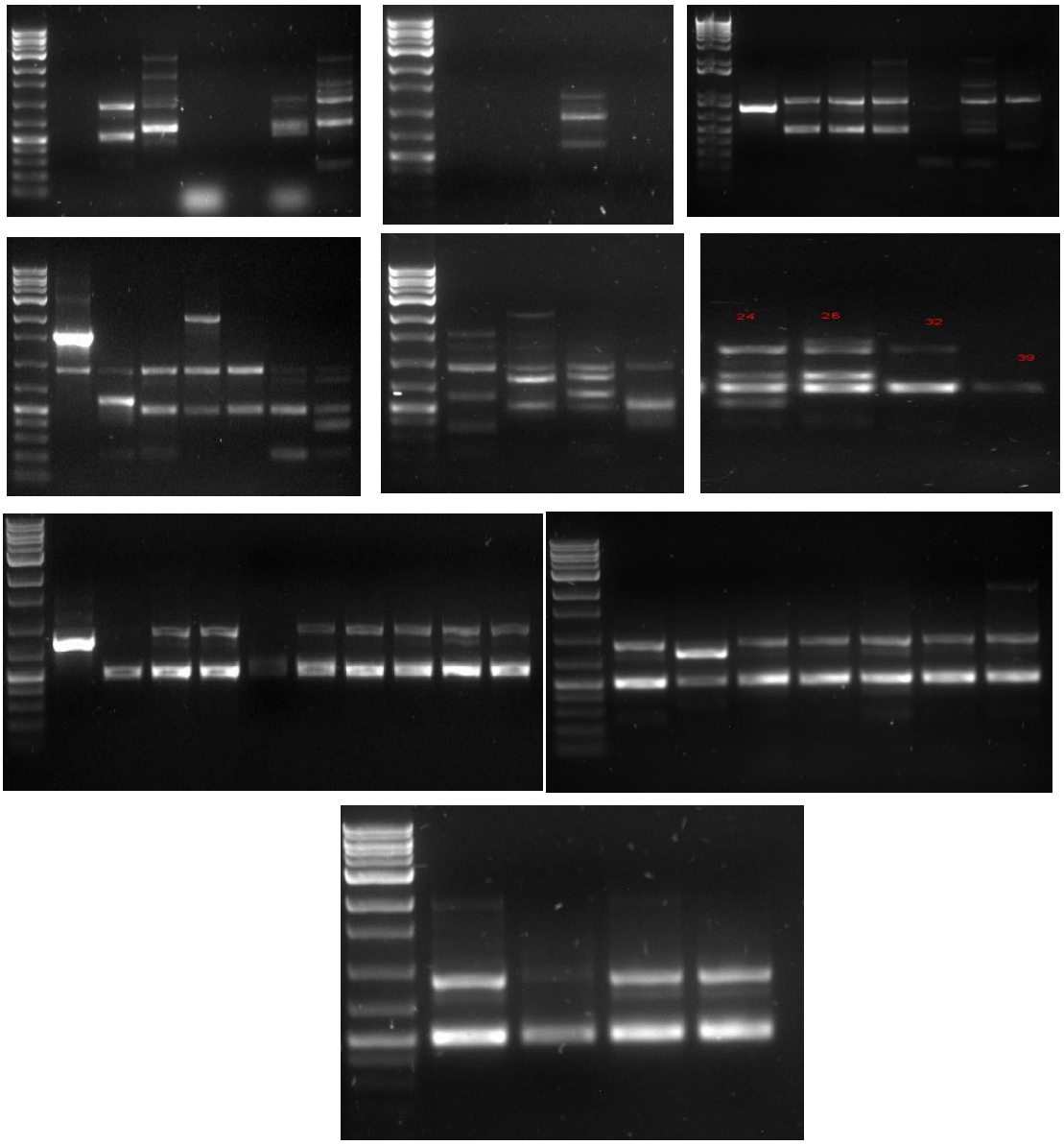


Apêndice 6 – Imagens RAPD cepas indivíduo 2

Cepas isoladas no meio de cultura MRS

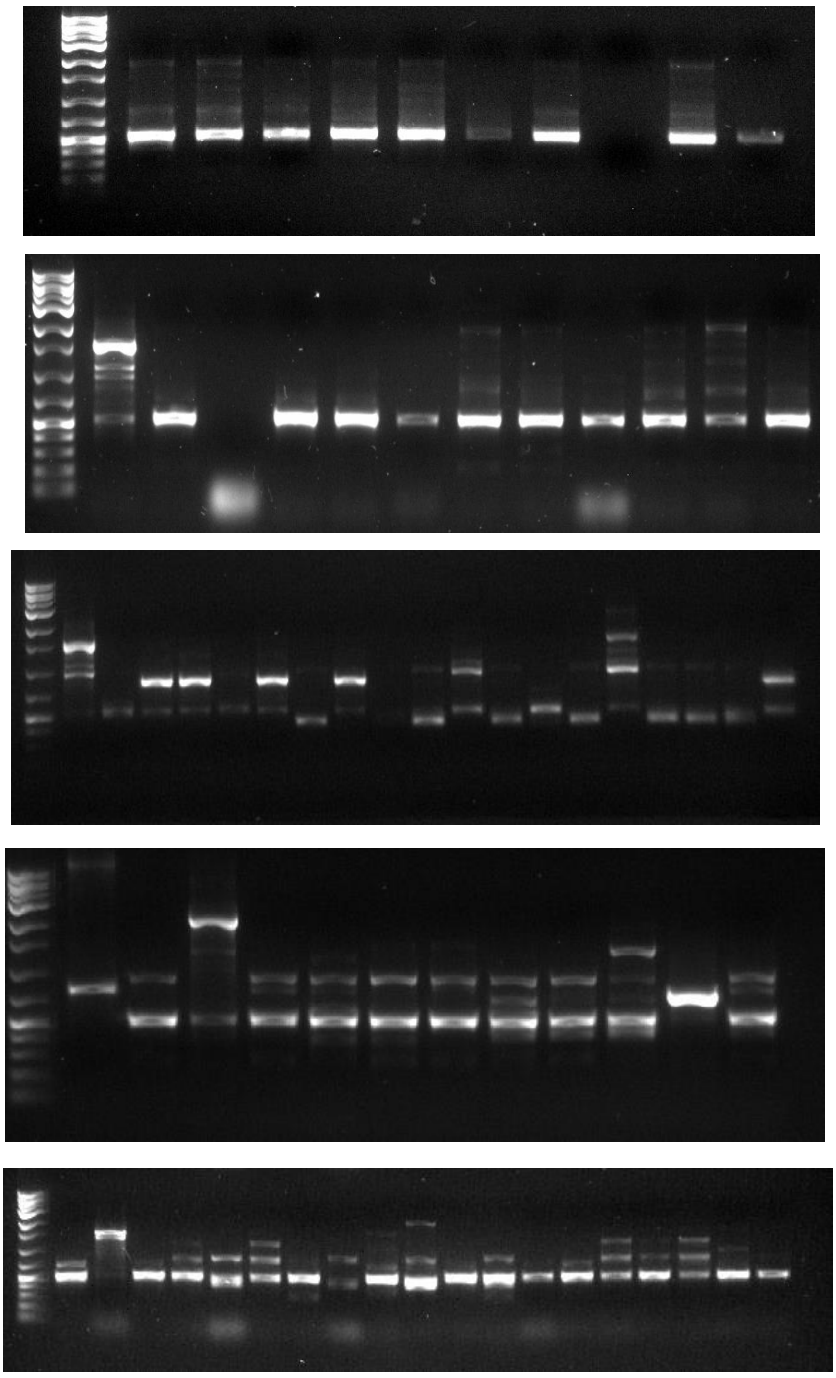


Cepas isoladas no meio de cultura BIM-25

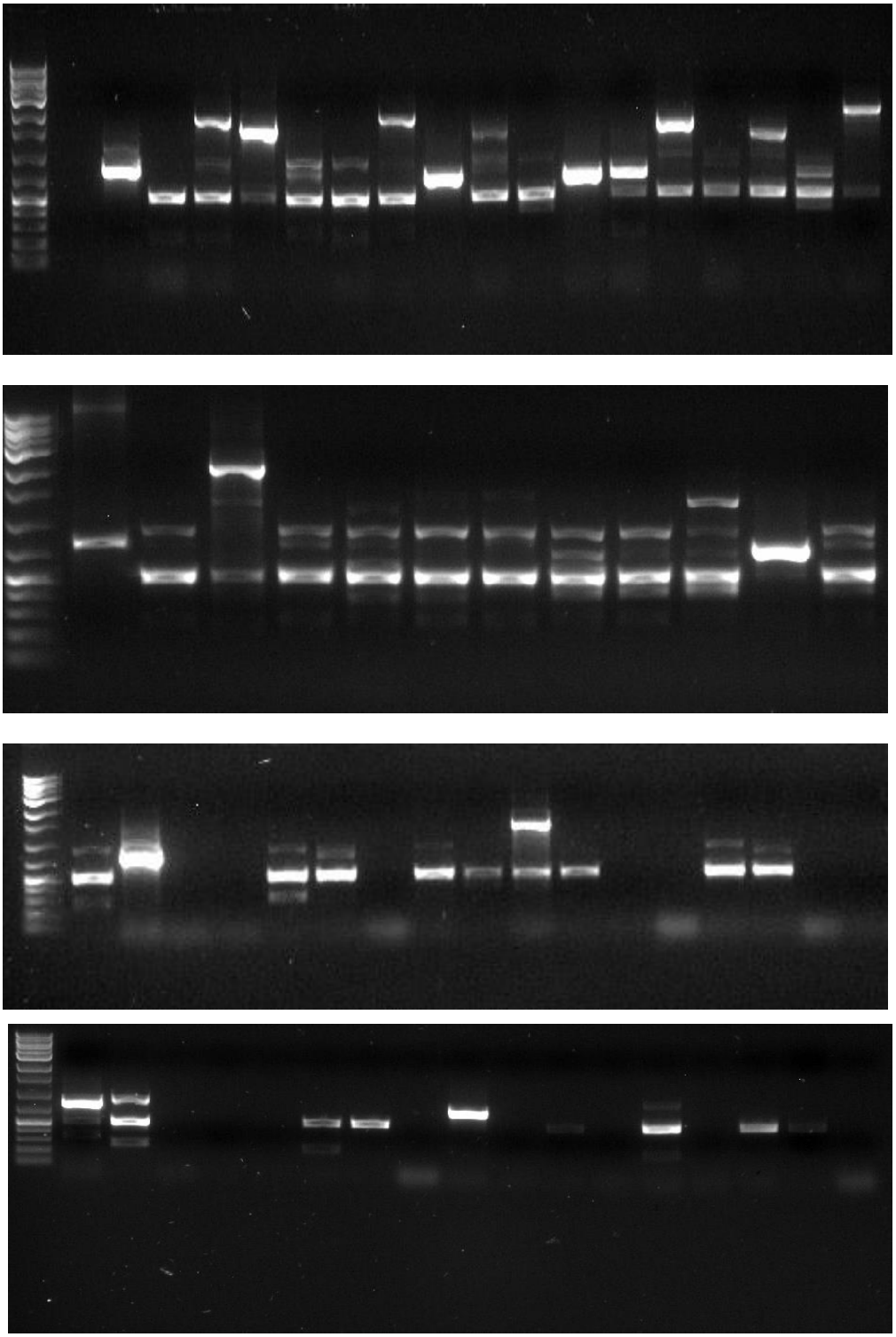


Apêndice 7– Imagens RAPD cepas indivíduo 3

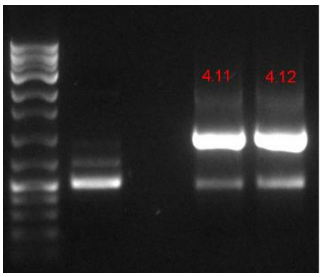
Cepas isoladas no meio de cultura MRS

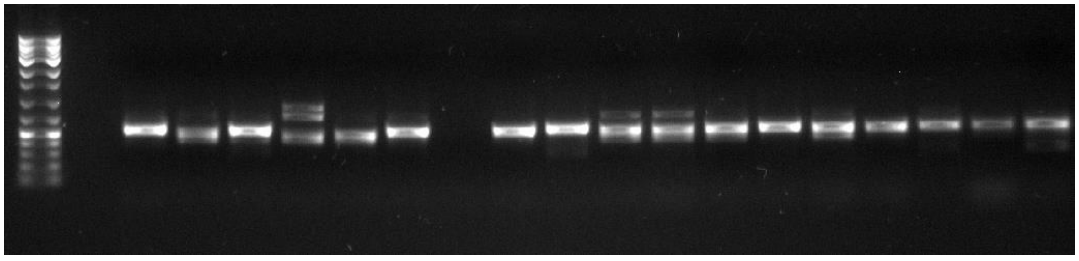


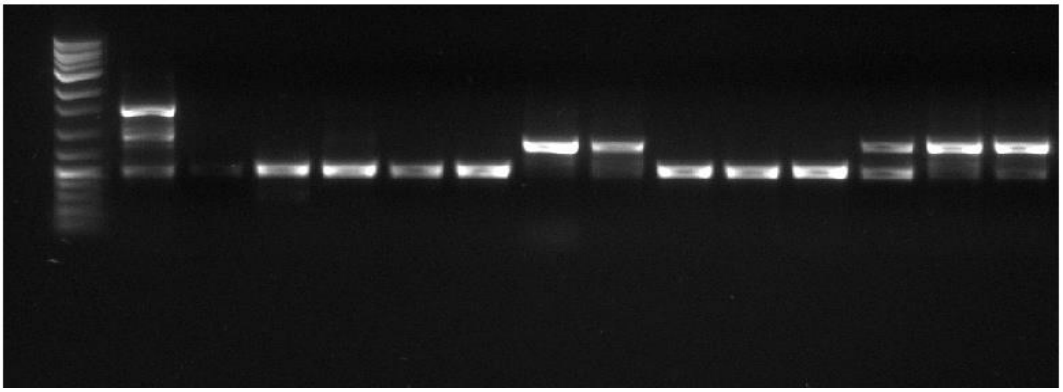
Cepas isoladas no meio de cultura BIM-25



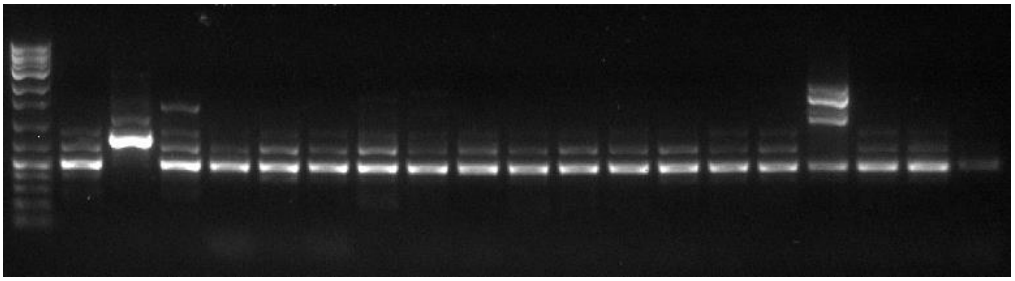
Apêndice 8 – Imagens RAPD cepas indivíduo 4
Cepas isoladas no meio de cultura MRS

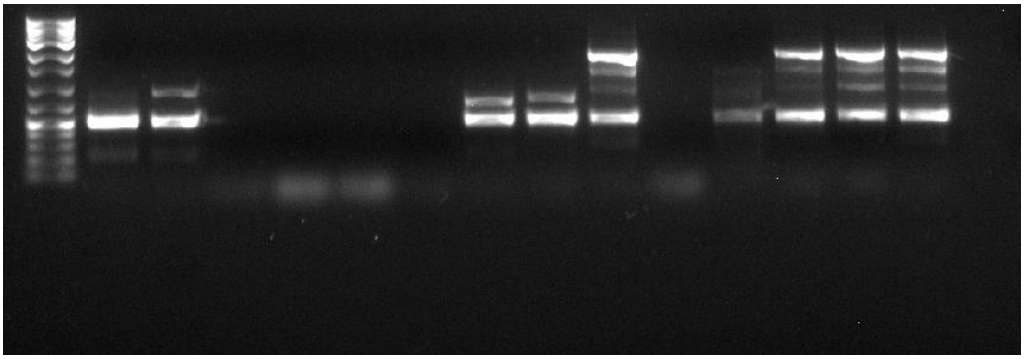


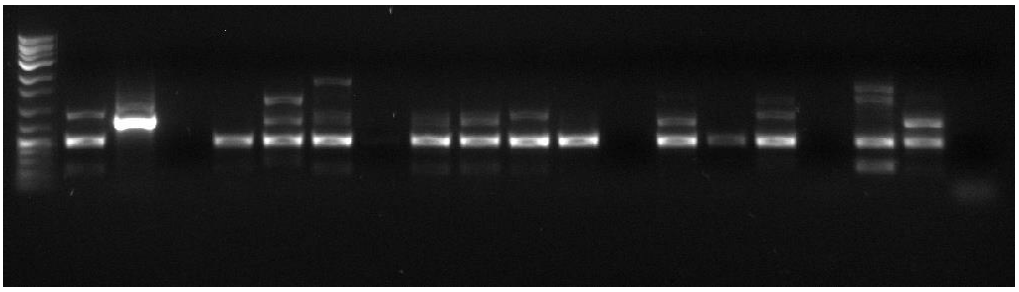




Cepas isoladas no meio de cultura BIM-25

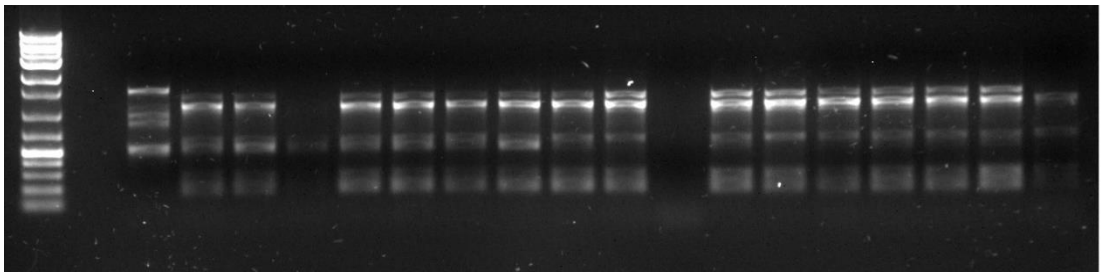


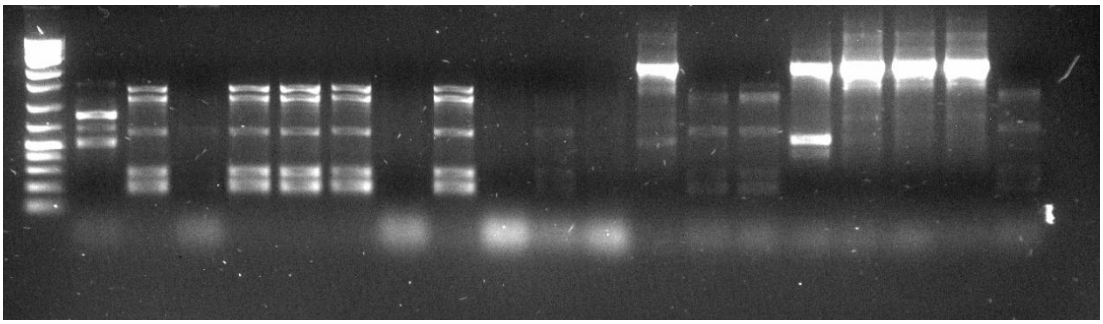


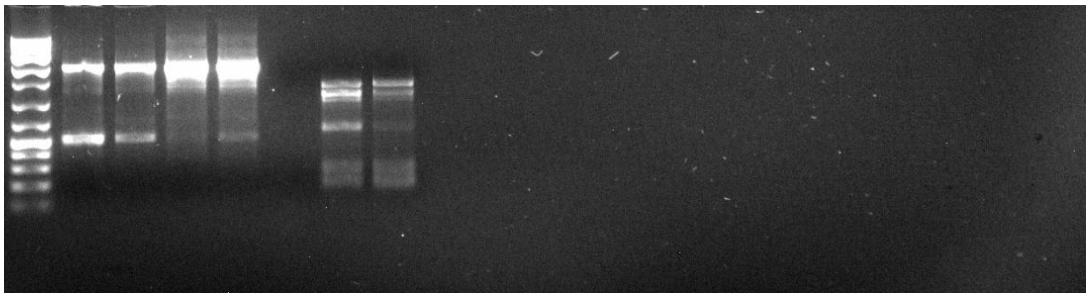


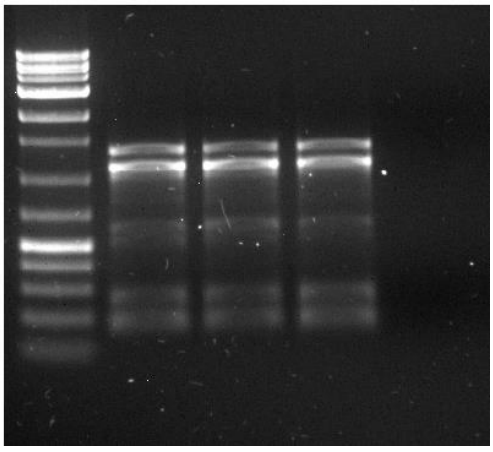
Apêndice 9 – Imagens RAPD cepas indivíduo 5

Cepas isoladas no meio de cultura MRS









Cepas isoladas no meio de cultura BIM-25

