

GIOVANNA LOPES BOMGIOVANNI

**AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE
PREBIÓTICOS NO CRESCIMENTO DE
BACTÉRIAS ANAERÓBIAS**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO
DE GÓES UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2017**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues e coorientação da Professora Karla Rodrigues Miranda.

CIP - Catalogação na Publicação

695a Bomgiovanni, Giovanna Lopes
Avaliação da interferência de prebióticos no crescimento de bactérias anaeróbias / Giovanna Lopes Bomgiovanni. -- Rio de Janeiro, 2017.
68 f.

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues.
Coorientadora: Karla Rodrigues Miranda.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. Microbiota. 2. Clostridium. 3. CDI. 4. Biofilme. I. Domingues, Regina Maria Cavalcanti Pilotto, orient. II. Miranda, Karla Rodrigues, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Foi preciso que eu enfrentasse muitos medos, uns bobos e outros nem tanto, para chegar até aqui. Foi difícil ter a calma e a perseverança de enfrentá-los e não ficar pensando no que podia vir depois que eles passassem, mas além de eu ter encontrado forças em mim onde eu não sabia que tinha, muitas pessoas foram essenciais para que isso acontecesse. Então, primeiramente, agradeço aos meus pais por terem me dado todo apoio para que eu conseguisse iniciar uma parte do meu sonho, que era fazer faculdade na UFRJ e no curso que eu sou apaixonada desde o segundo ano do Ensino Médio.

Às minhas amigas do colégio, que independente da distância que tivemos quando eu comecei o curso estiveram comigo nos melhores e piores momentos. Obrigada por sempre entenderem que nesses últimos meses eu não podia fazer quase nada com vocês (por causa desse filho que se chama monografia haha). Amo muito vocês, não consigo escrever o quanto vocês são importantes para mim!

À minha família número 2, Silvia, Sidney, Sidcley, Jefferson e Nathalia (já pode considerar que é da família né? ahaha) que me adotou ou que eu forcei a adoção por ficar mais na casa deles do que da minha. Super mega obrigada por serem do jeitinho que vocês são!! Especialmente ao Sid, por desde o início do ano falar que eu já tinha que ter começado a escrever (vc sempre teve razão sobre isso ahaha); por me apoiar e comemorar junto comigo quando eu escrevi meu primeiro parágrafo do plano depois de um dia todo; por me dar um exemplo vivo e bem na minha frente, mesmo que sem querer, do que é correr atrás do que gosta e quer pra vida; por me mostrar que divulgar a ciência é muito mais complexo que parece e que tudo que você faz para isso acontecer é incrível. Você é fantástico! Obrigada por tudo isso e muito mais! Adoro você, muito.

À todos os amigos que fiz nessa faculdade: Dede, por ser tão você, dramática que só, de um jeito único e maravilhoso, que foi minha amigona em todo esse tempo de faculdade/laboratório e que me apresentou a sua família toda que eu gosto tanto. Te amo mesmo você não gostando de demonstrações de carinho; Isa coisa mais linda da vida, obrigada por estar me dando força pra passar do terror que se chama Imunopatologia; Fefe, essa é falsa e fedida que não vale um centavo, mas faz a alegria de em qualquer lugar e é querida por qualquer pessoa; Livia, por ser SUPER CALMA e compartilhar o desespero sempre; Scar, por ser a pessoa mais sincera que eu conheço, ser a rainha das patadas bem dadas e mesmo assim ser esse doce de pessoa; Luiza, a fantasma que nunca aparece mas que sinto muita falta de ter contato todos os dias; e Wes que, nessa reta final, sempre que pode me

esperou até tarde da noite no Lab pra eu não ir pro estacionamento sozinha e que me empresta Falcon nos tempos de crise. Obrigada por serem assim, estranhos do jeito que são, mas que me faz muito feliz!

À quatro pessoas que me ensinaram mais do que como a fazer um resumo pra jornada de iniciação científica, como montar um pôster, como fazer uma curva de crescimento ou até mesmo um PCR. Leandro, meu primeiro orientador, obrigada por todos os esporros e por entender o meu lado em algumas situações complicadas; Renatinha, por ter sido minha co-orientadora do projeto antigo, me ensinando tudo que eu sei sobre PCR (não foram poucos, né? Ahahaha), e por sempre ser um ombro amigo. Torço muito para que você consiga passar em todos esses mil concursos que você está fazendo, e assim poder escolher pra onde você vai, mas vai ser muito triste não ver você sempre aqui e não poder perguntar se você já almoçou quando está brava; Regina, pessoa mais fofa do mundo, que ganhou meu coração assim que eu cheguei no Lab. Muito obrigada por tudo!!; Karlinha, a gente se embola em algumas contas mas no final Heidi/Felipe salvam a gente e da tudo certo. Muito obrigada por ficar empolgada quando eu fico e por me incentivar quando parece que tudo dar errado. Você foi muito importante, principalmente nessa reta final e eu devo muito (mesmo) a você!! Amo muito vocês!!!

À continuação da minha família número 3, os Anaeróbios! Especialmente a Karinne (a mutante, cada mês tem uma cor diferente de cabelo. Ah, para de me deixar sem graça com tuas piadas!!), Camilla (obrigada por estar sempre disposta a ajudar e por ser essa pessoa séria que até me deu um certo medo quando eu entrei no Lab, mas que é uma palhaçona), Isadora (é nova na família mas já tem o coração de todos), Juliana (a Soares, rainha das curvas de crescimento), Joaquim (salvador de todos) Juliana (a Reviello, por só me ouvir pedir *S. epidermidis* e nunca reclamar), Leandro (o Carneiro, por divertir todos sempre), Mayara (um anjinho maravilhoso, que explica tudo que souber na maior calma e paciência do mundo), Edu (o que sempre tem um vídeo engraçado pra mostrar), Kelly (a Rainha), Lili (desculpa por ter esquecido seu nome antes haha), Marcela (por entender as ironias e continuar sempre com a implicância), Felipe (que sempre me socorre quando eu não consigo ligar o programa da curva e que, às vezes, quase nunca, deixa eu sentar na cadeira do Quim), Heidi (por me ajudar nas contas, nas frases que eu não consigo formular e por me emprestar as nossas filhas – *C. citroniae* e *C. scindens*) Melissa (que parece estar calma até desesperada).

À criadora do Sci-Hub Alexandra Elbakyan! Sem esse site eu não teria lido metade dos artigos que li.

À todo o pessoal do grupo Naked Party muito obrigada por me incluírem tão bem e

tão rápido. Vocês deixaram meus momentos de distração muito mais leves e divertidos. Que venham as próximas viagens juntos!!

À minha cachorrinha Bebel, que mesmo sem entender nada do que eu falava ou estava sentindo sempre esteve do meu lado em todos os momentos nos últimos 12 anos. Obrigada por ter sido o melhor presente que eu já ganhei na vida e aguentar tanta coisa até os seus últimos dias com a gente. Te amo muito e espero que, onde quer que esteja, fique tão feliz a ponto de sair correndo encostando em tudo que é parede do lugar, como fazia.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes nas pessoas da diretora Alane Beatriz Vermelho e da coordenadora de graduação Lígia Maria Torres Peçanha.

Às instituições de apoio à pesquisa: CNPq, PIBIC, FAPERJ e CAPES.

RESUMO
GIOVANNA LOPES BOMGIOVANNI
AValiaÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE PREBIÓTICOS NO
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS
Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

No intestino humano existem aproximadamente 10^{14} células microbianas e esses microrganismos têm como característica serem estáveis neste ambiente e apresentarem composição diversa. Essa microbiota é essencial para manutenção da saúde impedindo, por exemplo, o estabelecimento de agentes patogênicos, como *Clostridium difficile*. *Clostridium citroniae* e *Clostridium scindens* são bactérias componentes da microbiota intestinal que podem exercer a função de barreira às infecções ocasionadas por patógenos. Frutooligossacarídeos (FOS) e inulina são fibras solúveis usadas amplamente como prebióticos associados ao estímulo do crescimento de bactérias benéficas intestinais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a interferência dos prebióticos inulina, FOS e a combinação destes no crescimento de *C. citroniae*, *C. scindens* e *C. difficile* ribotipos hipervirulento 027 e brasileiro 135, além da análise da produção de biofilme e interferência de prebióticos da mesma. Suspensões bacterianas (10^8 UFC/mL) foram inoculadas em microplacas contendo as três diferentes condições citadas em concentrações variáveis de 1% a 8% sendo o crescimento acompanhado em leitor de ELISA utilizando a densidade óptica em espectro de 620 nm (DO_{620}) por 24 horas. Resultados revelaram a capacidade de redução do crescimento de cepas de *C. difficile* pelos prebióticos testados (concentrações de 4% e 8%). Para a cepa de *C. citroniae* testada, não foram encontradas concentrações dos prebióticos que estimulasse o seu crescimento e em algumas condições a espécie teve o crescimento reduzido quando comparado ao controle. Os resultados encontrados para a cepa de *C. scindens* estudada não permitiram análises tendo em vista possíveis erros de ajuste nos inóculos das curvas de crescimento. Através de ensaios para verificação da produção de biofilme em microplacas, as cepas de *C. difficile* testadas foram categorizadas como forte produtora (ribotipo 027) e produtora moderada de biofilme (ribotipo 135). As cepas de *C. citroniae* e *C. scindens* foram categorizadas como fracas produtoras de biofilme pelo método utilizado. Em ensaios de co-cultivo, a cepa de *C. difficile* do ribotipo 135, mostrou redução na produção de biofilme quando co-cultivada com *C. citroniae*, mas não mostrou diferença frente a *C. scindens*. A cepa de *C. difficile* do ribotipo 027 não apresentou diferença significativa na produção de biofilme tanto na presença de *C. citroniae* quanto de *C. scindens*. A concentração de 1% dos prebióticos foi utilizada para avaliação da interferência na produção de biofilme. Os resultados não puderam ser considerados tendo em vista que os controles positivos não expressaram biofilme. A possível interferência dos prebióticos testados no crescimento de *C. difficile* e a interferência na expressão de um fator de virulência justificam a continuidade deste estudo. É fato que os prebióticos, probióticos e simbióticos surgem como potenciais formas de prevenir e/ou tratar infecções associadas à disbioses e o delineamento de novas propostas terapêuticas poderão surgir do conhecimento do efeito destes em patógenos e em componentes da microbiota intestinal.

Palavras-chave: microbiota, *Clostridium*, CDI e biofilme.

ABSTRACT
GIOVANNA LOPES BOMGIOVANNI
EVALUATION OF THE INTERFERENCE OF PREBIOTICS IN THE
GROWTH OF ANAEROBIC BACTERIA

Orientador(a): Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

In the human gut there are approximately 10^{14} microbial cells and these microorganisms have as characteristic to be stable in this environment and to present diverse composition. This microbiota is essential for health maintenance, preventing the establishment of pathogens such as *Clostridioides difficile*. *Clostridium citroniae* and *Clostridium scindens* are bacterial components of the gut microbiota that may act as a barrier to infections caused by pathogens. Fructooligosaccharides (FOS) and inulin are soluble fibers widely used as prebiotics associated with stimulating the growth of beneficial intestinal bacteria. The present study aimed to evaluate the interference of prebiotics inulin, FOS and the combination of these in the growth of *C. citroniae*, *C. scindens* and *C. difficile* ribotypes hypervirulent 027 and Brazilian 135, besides the analysis of the biofilm production and interference of prebiotics of the same. Bacterial suspensions (10^8 CFU/mL) were inoculated in microplates containing the three different conditions quoted in varying concentrations of 1% to 8%, and the growth was stored in an ELISA reader using the optical density in the spectrum of 620nm (DO_{620}) for 24 hours. Results revealed the ability to reduce the growth of *C. difficile* strains by the prebiotics tested (concentrations of 4% and 8%). For the *C. citroniae* strain tested, no prebiotic concentrations were found that stimulated its growth and in some conditions the species had a reduced growth when compared to the control. The results found for the *C. scindens* strain studied did not allow for the analysis of possible adjustment errors in the growth curve inocula. Through assays to verify biofilm production on microplates, the *C. difficile* strains tested were categorized as a strong producer (ribotype 027) and a moderate biofilm producer (ribotype 135). The strains of *C. citroniae* and *C. scindens* were categorized as low biofilm producers by the method used. In co-cultivation trials, the *C. difficile* strain of ribotype 135 showed a reduction in biofilm production when co-cultivated with *C. citroniae*, but showed no difference against *C. scindens*. The *C. difficile* strain of ribotype 027 showed no significant difference in biofilm production in the presence of both *C. citroniae* and *C. scindens*. The concentration of 1% of the prebiotics was used to evaluate the interference in biofilm production. The results could not be considered since positive controls did not express biofilm. The possible interference of the tested prebiotics in the growth of *C. difficile* and the interference in the expression of a virulence factor justify the continuity of this study. It is a fact that prebiotics, probiotics and symbiotics appear as potential ways to prevent and/or treat infections associated with dysbiosis and the design of new therapeutic proposals may arise from the knowledge of their effect on pathogens and components of the intestinal microbiota.

Key words: microbiota, *Clostridium*, CDI and biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de crescimento de <i>C. difficile</i> SJ1 135 com e sem a presença de prebióticos.....	28
Figura 2: Curva de crescimento de <i>C. difficile</i> R20291 com e sem a presença de prebióticos.....	29
Figura 3 Curva de crescimento de <i>C. citroniae</i> com e sem a presença de prebióticos.....	30
Figura 4: Curva de crescimento de <i>C. scindens</i> com e sem a presença de prebióticos.....	31
Figura 5: Biofilme feito na câmara de anaerobiose com as bactérias do estudo.....	32
Figura 6: Avaliação da produção de biofilme quando em co-cultivo e sozinhas.....	33
Figura 7: Comparação da produção de biofilme com e sem prebiótico feita pelas bactérias do estudo feito em jarra de anaeróbios.....	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Bactérias classificadas em <i>clusters Clostridium</i> sp., incluindo espécies relacionadas não pertencentes ao gênero.....	09
Quadro 2: Estudos com prebióticos e seus efeitos na microbiota.....	18

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
G	Gramma
Mg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrometros
mL	Mililitros
ANOVA	Análise de variância, do inglês: <i>Analyses of variance</i>
ASS	Agar Sangue Suplementado
ATCC	Do inglês: <i>American Type Culture Collection</i>
AXOS	Arabinoxilanoligossacarídeo
BDNF	Do inglês: <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHI	Do inglês: <i>Brain Heart Infusion</i>
CDAD	Do inglês: <i>Clostridioides difficile associated diarrhea</i>
CDC	Do inglês: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDCA	Ácido quenodesoxicólico
CDI	Do inglês: <i>Clostridioides difficile infection</i>
CDT	Do inglês: <i>Clostridioides difficile toxin</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CHOS	Chitooligossacarídeos
DCA	Ácido deoxicólico
DII	Doença Inflamatória Intestinal

DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DO	Densidade Óptica
EIP	Do inglês: <i>Emerging Infections Program</i>
ELISA	Do inglês: <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
EHEC	Do inglês: <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
EPEC	Do inglês: <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
ETEC	Do inglês: <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOS	Frutooligossacarídeos
FMT	Do inglês: <i>Fecal Microbiota Transplant</i>
GABA	Do inglês: <i>Gamma-AminoButyric Acid</i>
GOS	Galactooligossacarídeos
HAIC	Do inglês: <i>Healthcar-Associated Infections-Community Interface</i>
HMP	Do inglês: <i>Human Microbiome Project</i>
IBD	Do inglês: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IBS	Do inglês: <i>Irritable Bowel Syndrome</i>
LCA	Ácido litocólico
MetaHIT	Do inglês: <i>METAgenomics of the Human Intestinal Tract</i>
MCA	Ácido muricólico
ω -MCA	Ácido ω -mucólico
MOS	Mananoligossacarídeos
POS	Oligossacarídeos pécticos
pH	Potencial Hidrogênico

PRAS	Pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente
RNAr	Do inglês: <i>Ribonucleic acid ribossomal</i>
SCFAs	Do inglês: <i>Short Chain Fatty Acids</i>
SII	Síndrome do intestine irritável
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNK	Do inglês: <i>Student-Newman-Keuls</i>
TCA	Ácido taurocólico
TEA	Transtornos do Espectro Autista
TOS	Oligossacarídeos transgalactosilados
TGI	Trato Gastrointestinal
TcdA	Toxina A, do inglês: <i>Toxin A</i>
TcdB	Toxina B, do inglês: <i>Toxin B</i>
UDCA	Ácido muricólico
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VRE	Do inglês: <i>Vancomycin-Resistant Enterococcus</i>
XOS	Xilooligossacarídeos

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Microbiota humana intestinal	1
1.1.1. Equilíbrio da microbiota	1
1.1.2. Desequilíbrio da microbiota	5
1.2. Gênero <i>Clostridioides</i> e <i>Clostridium</i>	7
1.2.1. Clostrídeos da microbiota	10
1.2.1.1. <i>Clostridium citroniae</i>	10
1.2.1.1. <i>Clostridium scindens</i>	11
1.2.2. Clostrídeos patogênicos	15
1.2.2.1. <i>C. difficile</i>	12
1.2.2.2. Tratamento das CDI	14
1.3. Biofilme	15
1.4. Prebióticos	17
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Cepas bacterianas e condições de cultivo	25
4.2. Diluição dos prebióticos	25
4.3. Avaliação da interferência dos prebióticos na curva de crescimento	25
4.4. Biofilme	26
4.4.1. Avaliação da produção de biofilme em condições de monocultivo e co-cultivo	26
4.4.2. Avaliação da produção de biofilme em condições de monocultivo na presença dos prebióticos	27
4.4.3. Análise estatística	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Curva de crescimento	28
5.2. Biofilme	32
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota intestinal humana

Determinadas partes do corpo albergam populações heterogêneas de espécies microbianas que podem, em situações de equilíbrio, trazer benefícios para o organismo hospedeiro. Este conjunto microbiano é designado como microbiota, o qual é composto por bactérias e outros microrganismos (arqueas, fungos, protozoários e alguns vírus) (Costello e Relman, 2014). A microbiota pode afetar diferentes funções metabólicas, neurológicas e imunológicas (Tan *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, foi proposto que o número de células microbianas presentes nas populações de microbiota do trato gastrointestinal (TGI), era cerca de dez vezes maior do que o de células hospedeiras. Alguns estudos sugeriram que aproximadamente 90% das células encontradas no corpo humano eram de origem procariótica, podendo ser encontradas, pelo menos, 40.000 espécies bacterianas pertencentes a 1.800 gêneros (Arumugam *et al.*, 2013). Porém, em 2016, Sender e colaboradores, demonstraram que essa diferença não era tão grande a partir de experimentos que evidenciaram que um homem adulto possui, em média, 30 trilhões de células humanas e 39 trilhões de células microbianas e esse número seria igualado após a evacuação (Sender, Fuchs e Milo, 2016). Sabe-se hoje que adultos possuem um microbioma intestinal estável e diversificado, com a predominância dos filos microbianos Firmicutes e Bacteroidetes, seguidos de Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia e Fusobacteria, que têm capacidades funcionais específicas (Morgan, Segata, e Huttenhower, 2013). Esta complexa população microbiana ajuda a manter o equilíbrio do metabolismo hospedeiro e as metodologias atualmente disponíveis têm possibilitado estudos mais aprofundados dos padrões de saúde ou doença (Alander *et al.*, 1999; Lopetuso *et al.*, 2014; Browne *et al.*, 2016).

1.1.1. Equilíbrio da microbiota:

É fato que as bactérias residentes na microbiota são cruciais para prevenir a colonização do TGI por microrganismos exógenos e, portanto, são altamente relevantes na prevenção da invasão de tecidos por patógenos e microrganismos oportunistas como *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., leveduras, dentre outros

(Vollaard e Clasener, 1994; Guarner e Malagelada, 2003; Isolauri *et al.*, 2004). A resistência à colonização é mais notável em dois “habitats” no TGI: no conteúdo do lúmen e nas superfícies da mucosa. No conteúdo do lúmen, o mecanismo mais importante é a produção de metabólitos por componentes da microbiota, tais como ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs, do inglês *Short Chain Fatty Acids*); de substâncias antibacterianas, como bacteriocinas; e de ácidos acéticos e láticos (Vandenberg, 1993), que diminuem o pH e favorecem um grande número de lactobacilos a inibirem o crescimento de agentes patogênicos bacterianos, como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, do inglês *Enterohemorrhagic Escherichia coli*) O157:H7 (Gopal *et al.*, 2001), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC, do inglês *Enterotoxigenic Escherichia coli*), *E. coli* enteropatogênica (EPEC, do inglês *Enteropathogenic Escherichia coli*), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridioides difficile* (St. Amant, Valentin-Bom e Jerse, 2002; Hillier *et al.*, 2016). Nas superfícies da mucosa intestinal, a ocupação por componentes da microbiota em sítios de adesão representa uma das principais formas de inibição física da colonização e, conseqüentemente, do início de determinados processos infecciosos e inflamatórios, como a Doença Inflamatória Intestinal (DII) (Hentges, 1992; Vollaard e Clasener, 1994; Mcfarland, 2000; Guarner e Malagelada, 2003).

Como já mencionado, os microrganismos intestinais atuam de forma decisiva no metabolismo hospedeiro, realizando uma variedade de vias metabólicas essenciais (Clarke *et al.*, 2014). Por exemplo, as vitaminas B₁₂ e K, essenciais na saúde do hospedeiro humano, são sintetizadas pela microbiota intestinal. Os esteroides que, por sua vez, são produzidos no fígado e liberados no intestino pela vesícula biliar na forma de ácidos biliares, só poderão ser absorvidos após modificação por componentes da microbiota presentes neste sítio (Madigan *et al.*, 2010).

O Projeto Microbioma Humano (HMP, do inglês *Human Microbiome Project*) surgiu em 2008 e, através de diversas abordagens de análise metagenômica, tem auxiliado no entendimento de como o microbioma pode impactar a saúde humana. O HMP visou a criação de um banco de referência dos DNAs microbianos, a fim de definir a existência de um “core” microbiano que pode ser usado para determinar os padrões relacionados aos diferentes períodos de vida e locais do corpo. Aspectos relativos as variações nos microbiomas, com relação à proximidade genética dos

hospedeiros e a interferência ambiental, também se destacaram com o intuito de definir padrões relacionados a alterações na saúde humana (Proctor, 2016).

Sabe-se que os benefícios trazidos pela microbiota começam logo após o nascimento, quando o bebê é exposto pela primeira vez a uma população microbiana. Este primeiro padrão de colonização vai variar de acordo com o tipo de parto realizado, normal ou cesárea. Isso acontece porque a microbiota da vagina da mãe é diferente da microbiota da pele do abdômen, por onde é feita a incisão, assim como da pele dos primeiros contactantes (Adlerberth e Wold, 2009; Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Acredita-se que o intestino seja colonizado previamente por alguns anaeróbios facultativos como *E. coli* (Lobo *et al.*, 2013; Browne *et al.*, 2016) e, posteriormente, por anaeróbios estritos como espécies dos gêneros *Clostridium*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (Wang *et al.*, 2015). Borre e colaboradores sugeriram, em um estudo de 2014, que as primeiras bactérias estabelecidas no intestino do recém-nascido desempenham um papel crítico no desenvolvimento pós-natal do indivíduo e na maturação do sistema imunológico, endócrino e nervoso (Borre *et al.*, 2014).

A microbiota do leite materno e os seus constituintes, assim como a microbiota da pele areolar e a dieta, interferem no estabelecimento de um padrão de colonização (Pannaraj *et al.*, 2017). Isso porque os microrganismos presentes no leite e na pele areolar funcionam como uma suplementação probiótica. Com isso, é fato que o aleitamento materno traz benefícios para a saúde, como a redução do risco de doenças crônicas, como diabetes, obesidade e DII (Moretti, 2012).

A dieta é um importante fator que influencia na composição microbiana. Alguns alimentos são classificados como mais saudáveis por propiciarem o crescimento de bactérias benéficas ao corpo humano, levando a uma sensação de bem-estar; que poderia estar relacionada à produção de alguns hormônios, como a serotonina. Uma alimentação rica em proteínas, carboidratos e fibras, como os prebióticos, pode estimular o crescimento de bactérias benéficas ao corpo, como as bifidobactérias (Kumar *et al.*, 2016). No entanto, uma má alimentação poderia levar à diminuição dessa porção da microbiota produtora desse hormônio, levando, por exemplo, a menor disposição e sonolência (Ramirez-Farias *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2011; Dewulf *et al.*, 2013), além de causar outras desordens. Isso porque uma alta ingestão de gordura na dieta está associada ao aumento de adiposidade, inflamação crônica de baixo grau,

resistência à insulina e aumento da produção de ácido biliar. Todos esses fatores contribuem para o desenvolvimento de doenças como obesidade, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e câncer de cólon (Haghikia *et al.*, 2015). Diversos estudos têm comprovado que uma alimentação suplementada com probióticos (microrganismos vivos que, quando administrado em quantidades adequadas, promovem benefícios para a saúde do hospedeiro) e/ou prebióticos (componentes alimentares que estimulam a proliferação de bactérias desejáveis no intestino) (Power *et al.*, 2014) mostrou um efeito antiobesidade em animais (Yamano *et al.*, 2006; Alvaro *et al.*, 2007; Mountzouris *et al.*, 2009;).

Outros fatores influenciam na seleção e na manutenção dessa microbiota, como: a genética; exposição do recém-nascido ao ambiente hospitalar; o uso de antibióticos, tanto pela mãe, durante a gestação, tanto pelo bebê, após o nascimento; o ambiente que o recém-nascido se desenvolverá; se houve estresse ou infecção materna durante a gravidez; e, por fim, o tempo de gestação (Borre *et al.*, 2014)

Além da atividade direta na mucosa intestinal, pelas funções protetoras, estruturais e metabólicas essenciais para a saúde do hospedeiro (Grenham *et al.*, 2011), a produção de metabólitos pela microbiota intestinal pode ter um alcance muito além do compartimento gastrointestinal local (Forsythe *et al.*, 2010; Evans, Morris e Marchesi, 2013). A microbiota pode produzir hormônios que são liberados na corrente sanguínea, que podem agir tanto no sistema nervoso entérico (SNE) como em locais distantes do trato gastrointestinal como, por exemplo, no cérebro. Alguns estudos que sugerem que *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produzem triptofano, que é um precursor da serotonina, e outros aminoácidos que servem como neurotransmissores, e assim conseguem ter uma atuação não só no local onde estão presentes (Clarke *et al.*, 2014; Parmar, 2016). Alguns exemplos de metabólitos microbianos neuroativos são o ácido γ -aminobutírico (GABA, do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*) (Barrett *et al.*, 2012) e as monoaminas noradrenalina, dopamina e serotonina (Lyte, 2011). Comprovando esses dados, foi visto em ratos *germ-free* alterações da expressão gênica de algumas proteínas no hipocampo, como a diminuição na expressão do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), uma proteína chave envolvida na plasticidade neural e cognição. O mesmo resultado também foi detectado após a administração de antibióticos, sugerindo que a microbiota pode controlar a expressão gênica de diversas proteínas que são importantes para a atividade do Sistema Nervoso

Central (SNC) e do Sistema Nervoso Periférico (SNP) (Bercik *et al.*, 2011).

1.1.2. Desequilíbrio da microbiota:

As características de estabilidade e diversidade na composição da microbiota são consideradas essenciais para a saúde, mas também são facilmente passíveis de alterações potencialmente prejudiciais. Essas alterações podem acontecer, por exemplo, quando é administrado um antibiótico por via oral, apresentando como efeito além da inibição do crescimento do patógeno alvo, a interferência em componentes da microbiota normal. Com o desequilíbrio gerado nesta população anfíbio, podem ocorrer danos na função digestiva ou o desenvolvimento de processos infecciosos. Bactérias oportunistas como *C. difficile* ou *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE, do inglês *Vancomycin-Resistant Enterococcus*), podem se beneficiar desta supressão e dar início a processos infecciosos (Chow, Tang e Mazmanian, 2011).

No entanto, sabe-se hoje que, após o término da terapia com antimicrobianos, a microbiota pode ser restabelecida rapidamente, dependendo do antimicrobiano usado. Por exemplo, tem sido mostrado que o antimicrobiano vancomicina possui atividade residual levando a susceptibilidade a uma variedade de infecções secundárias, tanto em humanos quanto em camundongos. O efeito desse antimicrobiano pode durar de 6 meses a 1 ano, deixando a microbiota instável durante esse período (Jernberg *et al.*, 2007). Sendo assim, tem sido proposto o uso de probióticos, que são culturas vivas de bactérias que promovem benefícios à saúde. A rápida colonização intestinal por essas bactérias, pode reestabelecer uma microbiota local competitiva e fornecer produtos metabólicos microbianos desejáveis ao hospedeiro (Shanahan *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, algumas pesquisas descreveram nos últimos anos a relação da obesidade com modificações na microbiota intestinal. Foi também observado que ratos geneticamente obesos, deficientes em leptina (produzida pelos adipócitos) apresentavam uma redução na abundância de Bacteroidetes (geralmente encontrados em altos níveis em pessoas com peso adequado) e apresentavam um aumento proporcional de Firmicutes (geralmente encontrado em altos níveis em pessoas com sobrepeso) (Turnbaugh *et al.*, 2005). Ademais, foi verificado que ratos alimentados com uma dieta ocidental (com alto teor de gordura e açúcar) apresentavam alterações na microbiota. As consequências dessas mudanças na

composição, podem refletir em perfis bioquímicos diferentes e no metabolismo. Por exemplo, com a mudança para um padrão com predominância de Firmicutes, pode-se promover uma absorção mais eficiente de calorias, acompanhada do ganho de peso (Blaut e Klaus, 2012). Porém, também ainda permanece inconclusivo se a microbiota alterada precede o desenvolvimento de obesidade ou é uma consequência da ingestão de certos tipos de alimentos e diferenças fisiológicas do hospedeiro, assim como as configurações da comunidade associadas à doença (Flint *et al.*, 2012). Além da obesidade, outras doenças, como IBD (do inglês *Inflammatory Bowel Disease*), doença de Crohn e câncer (Lupton, 2004) também tem sido diretamente relacionadas a disbiose. Especificamente, a indução de IBD têm sido associada à redução de certos filos, como Firmicutes e Bacteroidetes (Belizário e Napolitano, 2015).

As interrupções do equilíbrio normal entre a microbiota intestinal e o hospedeiro têm sido também relacionadas à desnutrição (Kau *et al.*, 2011), a DII, IBD (Frank *et al.*, 2007; Dicksved *et al.*, 2008), e a distúrbios neurológicos (Gonzalez *et al.*, 2011). Entender como a microbiota intestinal pode afetar a saúde exige uma abordagem ecológica a fim de considerar a comunidade microbiana como um todo. O primeiro passo para a compreensão da relação simbiótica entre os microrganismos intestinais e seu hospedeiro é caracterizar a microbiota saudável e as diferenças que estão associadas à doença. Projetos de grande escala, como o europeu Metagenômica do Trato Intestinal Humano (MetaHIT, do inglês *METAgenomics of the Human Intestinal Tract*) e o já mencionado HMP (Consortium, 2013) fizeram progressos substanciais nesta área (Qin *et al.*, 2010). Uma vez compreendida a composição saudável e os estados funcionais da microbiota do intestino, podem ser determinadas as características que, quando interrompidas, estão associadas à doença. No entanto, a complexidade da microbiota e a variação entre e dentro de indivíduos dificulta a definição de um estado de saúde ideal. Apesar disto, é possível que esta informação possa ser usada para adaptar terapias ou ensaios clínicos (Lozupone *et al.*, 2012). Avanços recentes em técnicas moleculares demonstraram a existência de filos microbianos representando 98% da microbiota intestinal, sendo Firmicutes e Bacteroidetes os componentes majoritários (Eckburg *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006). As bactérias anaeróbias e não cultiváveis representam uma parcela significativa desta população (Browne *et al.*, 2016). No entanto, vários gêneros têm se destacado no desenvolvimento de infecções endógenas oportunistas. Algumas espécies do gênero

Clostridium, por exemplo, além de serem associadas a quadros de natureza exógena, como tétano, também podem atuar em infecções endógenas (Betriu, 2010; García-sánchez e Martín-del-rey, 2017).

1.2. Gênero *Clostridioides* e *Clostridium*

O gênero *Clostridium* e o recentemente descrito como *Clostridioides*, abrigam tanto populações microbianas que são descritas por serem da microbiota, quanto populações que, geralmente, são consideradas patogênicas ao hospedeiro. Esse gênero é considerado o mais heterogêneo dentre as bactérias anaeróbias, pois inclui espécies com diversas propriedades morfológicas, fenotípicas e bioquímicas, sendo um dos mais predominantes no trato intestinal humano. Pertencente à família Clostridiaceae e ao filo Firmicutes é composto por bacilos Gram positivos, formadores de esporos e obrigatoriamente anaeróbios, abrangendo mais de 150 espécies (Collins *et al.*, 1994; Suau, 1999 *apud* Warren *et al.*, 2006). De maneira geral, algumas espécies, por serem componentes de microbiota intestinal, podem causar infecções em todos os sítios corporais humanos, sendo estas associadas na maioria das vezes a quadros decorrentes de desequilíbrios nas populações anfíbias (Betriu, 2010). Algumas espécies são também amplamente encontradas no ambiente, sendo capazes de causar infecções de origem exógena, como *Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum* que se destacam na etiologia de quadros específicos associados à produção de toxinas, como o tétano e o botulismo, respectivamente (Alexander, 1995 *apud* Warren *et al.*, 2006).

O gênero se subdivide em 19 *clusters* com base em análise de sequência do gene de RNAr 16S. O *cluster* I apresenta a maioria das espécies de clostrídeos patogênicos e produtores de toxinas, como *C. tetani* e *C. perfringens*. O *cluster* XIV é dividido em dois “sub-*clusters*”: XIVa e XIVb. Os *clusters* IV e XIVa possuem a maioria dos clostrídeos componentes da microbiota e que não produzem toxinas. Vale a pena mencionar que inúmeras alterações taxonômicas aconteceram nos últimos anos e alguns clostrídeos foram alocados em outros gêneros, como *Clostridioides*, ou mesmo em outras famílias, sendo mantida a classificação em *cluster* (Lawson, Citron, Tyrrel e Finegold, 2016).

A maioria das bactérias destes grupos têm a capacidade de produzir SCFAs, especialmente butirato, como produto de fermentação. Dentre elas, estão vários membros do *cluster* XIVa, uma espécie do *cluster* XIV e três membros do *cluster* IV,

entre outros (Collins *et al.*, 1994; Kitahara *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2006). O butirato é descrito como um importante SFCA que possui diversas propriedades como: anti-inflamatório, anticâncer, indução das de Linfócitos T regulatório, entre outros. Além disso, o butirato, assim como o propionato, é encontrado em níveis similares tanto em indivíduos obesos como magros, diferentemente do acetato. Foi verificado que o seu nível é elevado nas fezes de indivíduos obesos, o que poderia estar associado ao aumento da produção microbiana intestinal, mas também pode sugerir uma diminuição da absorção ou utilização de SCFAs pelos colonócitos (células que fazem parte da mucosa intestinal) (Turnbaugh *et al.*, 2006; den Besten *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014). No Quadro 1 estão listadas as espécies e os respectivos *clusters*.

Quadro 1: Bactérias classificadas em *clusters Clostridium* sp., incluindo espécies relacionadas não pertencentes ao gênero (Collins *et al*, 1994; Kitahara, Takamine, Imamura e Benno, 2000; Warren, Tyrrell, Citron e Goldstein, 2006).

Cluster	Espécies
I	<i>C. absonum</i> , <i>C. baratii</i> , <i>C. caliptrosporum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. beijerinckii</i> , <i>C. carinoforum</i> , <i>C. favosporum</i> , <i>C. puniceum</i> , <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. beijerincki</i> , <i>C. puniceum</i> , <i>C. longisporum</i> , <i>C. chartatabidum</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. homopropionicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. botulinum</i> tipo C e D, <i>C. thermobutyricum</i> , <i>C. thermopalmarium</i> , <i>C. celatum</i> , <i>C. magnum</i> , <i>C. intestinalis</i> , <i>C. butyricum</i>
II	<i>C. histolyticum</i> , <i>C. limosum</i> , <i>C. proteolyticum</i>
III	<i>C. cellobioparum</i> , <i>C. termitidis</i> , <i>C. cellulolyticum</i> , <i>C. papyrosolvens</i> , <i>C. aldrichii</i> , <i>C. thermocellum</i> , <i>C. stercorarium</i> e <i>C. thermolactium</i>
IV	<i>C. leptum</i> , <i>C. sporosphaeroides</i> e <i>C. cellulosi</i>
V	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> , <i>Thermoanaerobacter brockii</i> , <i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> , <i>Thermoanaerobacter acetoethylicus</i> , <i>Acetogenium kivui</i> e <i>C. thermocopriae</i>
VI	<i>C. thermoaceticum</i> e <i>C. thermoautotrophicum</i>
VII	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> , <i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i> , <i>Thermoanaerobacterium lactoethylicum</i> , <i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> , <i>C. thermoamylolyticum</i> e <i>C. thermosaccharolyticum</i>
VIII	<i>Syntrophomonas wolfei</i> , <i>Syntrophospora bryantii</i>
IX	<i>Selenomonas sputigena</i> , <i>Zymophilus paucivorans</i> , <i>Selenomonas lactificifex</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>ruminantium</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>lactilytica</i> , <i>Pectinatus frisingensis</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Sporomusa termitida</i> , <i>Sporomusa paucivorans</i> , <i>C. quercicolum</i> , <i>Phascolarctobacterium faecium</i> , <i>Acidaminococcus fermentans</i> , <i>Quinella ovalis</i> , <i>Clostridioides difficile</i>
XX	<i>Anaerocellum thermophilum</i> , <i>Caldocellum saccharolyticum</i> e <i>Thermoanaerobacter cellulolyticus</i> .
XI	<i>C. ghonii</i> , <i>Eubacterium tenue</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. bifermentans</i> , <i>C. manganotii</i> , <i>C. irregularis</i> , <i>C. lituseburensis</i> , <i>C. glycolicum</i> , <i>C. mayombei</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>C. paradoxum</i> , <i>C. thermoalcaliphilum</i> , <i>C. litorale</i> , <i>C. sticklandii</i> , <i>C. falsineum</i> , <i>C. formicoaceticum</i> , <i>C. halophilum</i> , <i>C. villosum</i> e <i>C. aminobutyricum</i>
XII	<i>C. hastiforme</i> , <i>Clostridium</i> sp BNII, <i>C. filamentosum</i> , <i>C. acidiurici</i> e <i>C. purinolyticum</i>
XIII	<i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Peptostreptococcus hydrogenalis</i> , <i>Peptostreptococcus tetradius</i> , <i>Peptostreptococcus lacrimalis</i> , <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> , <i>Peptostreptococcus magnus</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> e <i>Helcococcus kunzii</i>
XIVa	<i>Acetitamaculum ruminis</i> , <i>C. aminophilum</i> , <i>Roseburia cecicola</i> , <i>C. symbiosum</i> , <i>C. clostridiiforme</i> , <i>Clostridium</i> sp DSM 6877, <i>C. aerotolerans</i> , <i>C. xylanolyticum</i> , <i>C. celerecrescens</i> , <i>C. sphenoides</i> , <i>C. oroticum</i> , <i>Ruminococcus torques</i> , <i>C. nexile</i> , <i>C. coccoides</i> , <i>Streptococcus hansenii</i> , <i>Peptostreptococcus productus</i> , <i>Eubacterium cellulosolvans</i> , <i>C. aminovalericum</i> , <i>C. populeti</i> , <i>C. polysaccharolyticum</i> , <i>C. hydroxybenzoicum</i> , <i>C. citroniae</i> e <i>C. scindens</i>
XIVb	<i>C. neopropionicum</i> , <i>C. propionicum</i> , <i>C. colinum</i> , <i>C. piliforme</i> , <i>C. lentocellum</i> e <i>Epulopiscium</i> . sp
XV	<i>C. barkeri</i> , <i>Eubacterium limosum</i> e <i>Eubacterium alactolyticum</i>
XVI	<i>Eubacterium bifforme</i> , <i>Spreptococcus pleomorphus</i> e <i>C. innocuum</i>
XVII	<i>Lactobacillus catenaformis</i> e <i>Lactobacillus vitulinus</i>
XVIII	<i>C. ramosum</i> e <i>C. spiroforme</i>
XIX	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Fusobacterium necrogenes</i> , <i>C. rectum</i> , <i>Propionigenium modestum</i> e <i>Leptotrichia buccalis</i>

Embora a maioria das espécies responsáveis por doenças tenham sido descobertas há décadas, nos últimos anos, a importância dos membros da classe Clostridia no microbioma intestinal tornou-se cada vez mais evidente (Stefka *et al.*, 2014; Minton *et al.*, 2016). Em situação de estresse, assim como na microbiota intestinal de indivíduos com Transtornos do Espectro Autista (TEA), já foi descrito um aumento de microrganismos do gênero *Clostridium* (Bailey *et al.*, 2011; Finegold, Downes e Summanen, 2012).

Algumas espécies de clostrídeos têm sido utilizadas na indústria de produtos químicos e novos estudos surgem a todo momento ilustrando um interesse crescente na prospecção de novas espécies para fins biotecnológicos (Stefka *et al.*, 2014; Minton *et al.*, 2016).

1.2.1. Clostrídeos da microbiota

1.2.1.1. *Clostridium citroniae*

Clostridium citroniae é um membro do cluster XIVa, que, junto com os clostrídeos do *cluster* IV e espécies de *Bacteroides*, compõe grande parte da microbiota intestinal humana (Lopetuso *et al.*, 2013). Pertencentes à família Lachnospiraceae, esses microrganismos se caracterizam por se apresentarem como Gram negativos, capazes de formar colônias planas, opacas a brancas, não hemolíticas, sendo esporos raramente observados (Warren *et al.*, 2006). A espécie é caracterizada por fermentar glicose, sacarose e lactose (Hold *et al.*, 2002; Antunes *et al.*, 2014).

Devido ao fato de terem sido recentemente descobertos, pouco se sabe sobre esses microrganismos. Em um trabalho desenvolvido por Antunes e colaboradores, foi observado que moléculas bioativas produzidas por *C. citroniae* apresentavam efeitos inibitórios na expressão de genes de virulência em *Salmonella*, principalmente aqueles associados à invasão de células hospedeiras (Antunes *et al.*, 2014). Além da função de antivirulência, *C. citroniae* possui funções necessárias para a saúde durante toda a vida humana, como a modulação do sistema imunológico, o fornecimento de fontes de energia para células do hospedeiro e para outros membros da microbiota intestinal e a manutenção da homeostase endócrina, seja interagindo com as demais populações de micróbios residentes, mas também com funções específicas e essenciais (Lopetuso *et al.*, 2013).

1.2.1.2. *Clostridium scindens*

Pouco também se sabe sobre a espécie *Clostridium scindens* (Studer *et al.*, 2016), também pertencente ao *cluster Clostridium XIVa* e caracterizada como Gram positiva (Morris *et al.*, 1985). Alterações taxonômicas recentes levaram também a inclusão da espécie na família Lachnospiraceae (Greathouse, Harris e Bultman, 2015).

As espécies pertencentes ao *cluster* de *Clostridium XIV* são relacionadas por apresentarem o operon do gene *bai* (“induzível por ácidos biliares”), que permite que essas bactérias façam uma das transformações de ácido biliar mais importantes, gerando ácido biliar secundário (Ridlon *et al.*, 2006, 2015). Isso é importante porque uma pequena parte dos ácidos biliares primários que não é absorvida pelo intestino, sofre ação de bactérias da microbiota intestinal, sendo convertidos nesses ácidos biliares secundários. Estes, então, poderão ser absorvidos pelo intestino e, com isso, atuar diretamente na gordura, transformando em moléculas menores como ácidos graxos e colesterol; e também na absorção de nutrientes da dieta (Pires e Colaço, 1999).

Porém, é certo que os ácidos biliares regulam a germinação, proliferação do esporo e crescimento vegetativo de *C. difficile* (Wilson *et al.*, 1982; Wilson, 1983). Essa reação foi vista tanto em ácidos biliares primários quanto em ácidos biliares secundários (Sorg e Sonenshein, 2010). A regulação acontece inibindo ou favorecendo esses eventos relacionados a esporulação. Por exemplo, os ácidos biliares primários taurocólico (TCA) e ácido cólico são comprovados germinantes de esporos de *C. difficile*. Contudo, sabe-se que o ácido biliar primário quenodesoxicólico (CDCA) inibe a germinação de *C. difficile* (Sorg e Sonenshein, 2010; Francis *et al.*, 2013b). Além disso, ácido biliar secundário deoxicólico (DCA), bem como o ácido biliar secundário litocólico (LCA), ácido biliar secundário ursodesoxicólico (UDCA) são inibidores fortes da proliferação de esporos e crescimento celular vegetativo de *C. difficile*. Esses resultados sugerem que o tipo de ácido que entrar em contato com esse patógeno vai favorecer ou não sua permanência no organismo do hospedeiro, evidenciando diretamente a importância da transformação do ácido biliar microbiano na resistência à infecção por *C. difficile*, através de microrganismos da microbiota, como *C. scindens* (Francis *et al.*, 2013b; Buffie *et al.*, 2015; Weingarden *et al.*, 2016). Com isso, acredita-se que essa espécie possa ter um papel importante na administração como um probiótico, evitando infecções graves por *C. difficile* (Lawley *et al.*, 2012). Um estudo que avaliou esse potencial probiótico mostrou que, após a

administração, houve um aumento na resistência à infecção por *C. difficile*, de forma secundária, ou seja, dependendo dos ácidos biliares produzidos. Logo, esse fator, além dos mencionados acima, reforça a importância desse microrganismo na manutenção da saúde (Buffie *et al.*, 2015).

1.2.2. Clostrídeos patogênicos

1.2.2.1. *C. difficile*

Em 1935, a espécie conhecida como *Clostridium difficile* até recentemente foi originalmente denominada *Bacillus difficilis* (Lawson *et al.*, 2016). Em 2013, foi proposta uma nova classificação para a espécie, que passaria a ser denominada *Peptoclostridium difficile* (Yutin e Galperin, 2013). No entanto, após análises de sequências de 16S RNAr, foi avaliada a extensão da diversidade filogenética do gênero e as verdadeiras relações entre eles. Foi observado que *C. difficile* é filogeneticamente próximo a espécie *Clostridium mangenotti*, com similaridade de 94,7%, sendo que ambos pertencem a família Peptostreptococcaceae. Sendo assim, após análises fenotípicas, quimiotaxonômicas e filogenéticas, ambas as espécies foram alocadas dentro de um novo gênero, *Clostridioides*. Portanto, a atual denominação desse microrganismo é *Clostridioides difficile*, tendo sido mantidas as siglas e a abreviação do nome da espécie, *C. difficile* (Lawson, Citron, Tyrrell, e Finegold, 2016).

A espécie é caracterizada como bacilos Gram positivos e é agente etiológico de diarreia associada a antibióticos (CDAD, do inglês *Clostridioides difficile Associated Diarrhea*), sendo os pacientes hospitalizados mais susceptíveis (infecção nosocomial), assim como pessoas com mais de 65 anos. A fim de tentar impedir que a CDI (do inglês *Clostridioides difficile Infection*), que está fundamentada na supressão da microbiota intestinal (Gerding, 2004), se dissemine, pesquisadores começaram a buscar novas formas de prevenção. Dados como: *C. difficile* sendo a causa de meio milhão de doenças em um ano, pessoas com mais de 65 anos serem as mais acometidas e taxa de mortalidade elevada (1 em cada 11 pessoas hospitalizadas morreu de CDI dentro de um mês após diagnóstico), despertaram a atenção dos pesquisadores para esse patógeno e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de mecanismos para diminuir sua incidência (CDC, 2015).

Um exemplo foi a criação do programa de vigilância de infecção pelo *C. difficile*,

que foi desenvolvido através da atividade da interface comunitária de infecções associadas a saúde (HAIC, do inglês *Healthcare Associated Infections-Community*) do programa de infecções emergentes do CDC (EIP, do inglês *Emerging Infections Program*). Os dados desse programa podem ser usados para caracterizar as cepas de *C. difficile* associadas à doença e monitorar tendências da doença a longo prazo. Em 2015, aproximadamente 11,7 milhões de pessoas estavam sob vigilância, auxiliando no mapeamento de casos novos (CDC, 2015).

C. difficile é capaz de produzir endosporos, que são altamente transmissíveis, resistentes e possuem um importante papel na transmissão das CDIs (Best *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2012). Uma das principais características de virulência da espécie é a expressão de duas toxinas: a toxina A (TcdA) e a toxina B (TcdB). O mecanismo de ação dessas toxinas leva ao arredondamento e morte celular das células alvo (Bella *et al.*, 2016).

A gravidade das CDIs vem mudando durante os últimos anos, provavelmente devido ao aparecimento de cepas hipervirulentas (Rupnik, Wilcox e Gerding, 2009; Yakob *et al.*, 2015) como as pertencentes ao ribotipo 027/NAP1/BI (do inglês *North American Pulsed Field type I*). Esse ribotipo, além de expressar quantidades aumentadas das toxinas A e B, em decorrência de uma deleção no regulador negativo da transcrição dos genes TcdA e TcdB, é capaz de expressar a toxina binária CDT (do inglês *Clostridioides difficile Toxin*), que potencializaria a ação das outras toxinas e a capacidade de aderência às células do hospedeiro. Em um estudo recente, foi relatado que a cepa R20291, pertencente ao ribotipo 027, é altamente produtora de biofilme, o que favoreceria a adesão, fixação e permanência no hospedeiro (Dapa *et al.*, 2013), e também têm apresentado níveis mais elevados de resistência às fluoroquinolonas (Yakob *et al.*, 2015).

O ribotipo 135 é exclusivamente brasileiro, produtor das toxinas A e B, mas não possui deleção do regulador *tcdC* nem produz a toxina binária como as cepas hipervirulentas. Com relação ao perfil de resistência antimicrobiana, esse ribotipo é sensível ao metronidazol, vancomicina e moxifloxacina e resistente à clindamicina, ciprofloxacina e levofloxacina (Balassiano *et al.*, 2010). Além desse ribotipo, Alcides e colaboradores, em 2007, também identificaram outros novos ribotipos brasileiros, sendo eles: 132, 133, 134, 136, 142 e 143 detectados em crianças, onde 133 foi o mais prevalente entre os isolados e pode apresentar, assim como 135, resistência à

clindamicina (Alcides *et al.*, 2007).

Sabendo que *C. difficile* é formador de esporos e que esses só são formados quando essa bactéria está em condição de estresse, ou seja, que ameaça a sobrevivência da célula, em biofilmes maduros essa bactéria vai possuir maior capacidade de esporulação. Com isso, *C. difficile* consegue se manter no organismo, podendo iniciar quadros de CDI sem serem afetados e ao mesmo tempo, podendo atuar como sítio acumulador de toxinas que, em certo momento, serão liberadas e promoverão, durante a colonização, o rompimento das células do epitélio intestinal (Semenyuk *et al.*, 2014).

Além disso, acredita-se que a formação do biofilme por *C. difficile* pode desempenhar papéis importantes em todas as fases da patogenicidade, mas principalmente na reincidência da doença (que acontece em até 40% dos casos de CDI) onde o biofilme dificultaria a remoção deste patógeno pelos movimentos durante o peristaltismo da mucosa do trato gastrointestinal. Ainda, contribui também como fator anti-fagocitário, sendo assim um fator importante para o patógeno em questão, pois impede toda cascata de sinalização que vai desenvolver a resposta imunológica contra esse patógeno (Dapa *et al.*, 2013; Semenyuk *et al.*, 2014; Pantaleon *et al.*, 2015).

Portanto, o estudo do biofilme em *C. difficile* é importante para contribuir para uma melhor compreensão do desenvolvimento de CDI, uma vez que o estudo em anaeróbios não é tão bem caracterizado, e também buscar modos para evitar a formação dessa estrutura em cepas patogênicas. Além disso, é muito importante esse estudo em bactérias componentes da microbiota do trato gastrointestinal porque, além de também favorecer o estudo em anaeróbios, pode-se avaliar se esse biofilme formado desenvolve uma proteção extra em infecções graves como casos de CDI (Pantaléon *et al.*, 2015).

1.2.3. Tratamento das CDIs

A terapia antimicrobiana tem sido relacionada ao desenvolvimento de CDI (Knoop, Owens e Crocker, 1993; Yip *et al.*, 2014), dependendo da quantidade de antibióticos administrados, dosagem e a duração da terapia (Wiström *et al.*, 2001; Owens *et al.*, 2008). O uso de antimicrobianos, como as fluoroquinolonas, aumenta o risco de CDI durante a terapia e até o período de três meses após a suspensão da terapia (Hensgens *et al.*, 2012). Sendo assim, essa infecção vem sendo alvo de terapias alternativas, como abordagens baseadas em probióticos e prebióticos, que restaurariam a

homeostase intestinal (Gerding, 2004; Chang *et al.*, 2008), e o transplante de microbiota fecal (FMT, do inglês *Fecal Microbiota Transplant*) (Weirdo, 2009). O FMT tem mostrado uma alta taxa de sucesso (80-95%) com durabilidade a longo prazo (Brandt *et al.*, 2012; Mattila *et al.*, 2012), podendo ser também realizado em regime ambulatorial (Heimann *et al.*, 2015).

1.3. Biofilme

Essas infecções, tanto endógenas quando exógenas, têm sido também relacionadas com a capacidade desses microrganismos formarem biofilme (Moormeier e Bayles, 2017). Biofilme é definido como sendo uma comunidade microbiana organizada, podendo ser formado em uma ampla variedade de superfícies (Donlan, 2001), onde os microrganismos são incorporados a uma matriz polimérica, que pode ser composta de polissacarídeos, DNA ou proteínas que auxiliam na aderência dessa população microbiana (Hall-Stoodley, Costerton e Stoodley, 2004). Este é o primeiro passo para a formação de biofilme e pode ser crucial, porque dependendo da natureza da superfície, a formação dele pode ser direcionada por diferentes mecanismos. Por exemplo, a aderência às superfícies abióticas é muita das vezes mediada por eventos não específicos que dependem, principalmente, da carga e da hidrofobicidade da superfície celular e da presença de polímeros extracelulares (Dunne, 2002). Já a ligação à superfícies bióticas, como os tecidos do hospedeiro e as células epiteliais da mucosa, pode ser mediada por receptores específicos e influenciada pelas respostas do hospedeiro à colonização bacteriana (Finlay e Falkow, 1989; Kline *et al.*, 2009).

Ainda que os passos iniciais da adesão sejam influenciados por fatores ambientais, estudos vêm mostrando que a atividade bacteriana também pode alterar o que se esperava acontecer nas primeiras etapas do processo de adesão. Isso acontece através da produção de moléculas anti-adesinas (que evitam a adesão), que têm a capacidade de modificar as propriedades físico-químicas da superfície ou por alteração na composição da barreira física bacteriana, impedindo o contato com a superfície pela presença de bactérias “competidoras” (Rendueles e Ghigo, 2012) através da ocupação rápida dos locais de adesão disponíveis (“cobertura superficial”). Essa estratégia foi demonstrada por An e colaboradores, que co-cultivaram em um modelo experimental a bactéria Gram negativa *P. aeruginosa* (patógeno oportunista do solo, normalmente não causa doenças em indivíduos imunologicamente saudáveis) com *Agrobacterium tumefaciens* (bactéria encontrada no solo,

relacionada à doença de gralha-da-coroa em plantas). Foi demonstrado que *P. aeruginosa* rapidamente se espalhava na superfície, evitando a adesão de *A. tumefaciens*. Porém, quando o co-cultivo foi realizado com uma cepa de *P. aeruginosa* mutante para o gene *flgK* e, então, deficiente em motilidade, e conseqüentemente incapaz de se espalhar rapidamente sobre a superfície, foi observado que *A. tumefaciens* era capaz de formar um biofilme de superfície misto com *P. aeruginosa*. Este estudo pode não ser totalmente aplicável para microbiologia médica, mas pode direcionar muitos outros estudos nesta área, uma vez que o solo tem um ecossistema complexo e diverso, similar a microbiota presente no trato gastrointestinal (An *et al.*, 2006).

Na segunda etapa do processo de formação de biofilme ocorre o acúmulo de células bacterianas, em múltiplas camadas. O terceiro passo é o amadurecimento, onde ocorre a multiplicação bacteriana das bactérias já aderidas e agregação de outros microrganismos às células pertencentes ao consórcio microbiano. Na última fase de desenvolvimento do biofilme, ocorre desprendimento das células, podendo dar início a um novo ciclo de formação de biofilme (Rohde *et al.*, 2010; Moormeier e Bayles, 2017).

A produção de biofilme é importante porque confere proteção às bactérias contra a falta de nutrientes e contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e antimicrobianos. Sendo assim, as bactérias que produzem biofilme ficam mais protegidas e, com isso, resistentes a determinadas condições extremas, como a presença de oxigênio (no caso de bactérias anaeróbias). Por exemplo, a produção do biofilme em *C. difficile* R20291 ribotipo 027 foi vista em um estudo *in vivo* em camundongos, auxiliando no processo de evasão ao sistema de defesa do hospedeiro, assim como no aumento da resistência à terapia antimicrobiana (Pantaleon *et al.*, 2015).

1.4. Prebióticos

Sendo assim, sabe-se que estudar esses prebióticos e o efeito deles sob essas bactérias patogênicas é de grande importância, visando melhores resultados do que quando administrado antimicrobianos. Esses compostos estimulam seletivamente o crescimento e atividade de bactérias benéficas do cólon, melhorando a saúde do seu hospedeiro. Os prebióticos têm sido propostos para prevenir a disbiose causada por antibióticos ou infecções e também para ajudar na restauração da microbiota (Reid *et al.*,

2010). Dentre os prebióticos atualmente em uso podemos citar: mananoligossacarídeos (MOS), oligossacarídeos pécnicos (POS), xilooligossacarídeos (XOS), galactooligossacarídeos (GOS), frutooligossacarídeos (FOS), chitooligossacarídeos (CHOS), oligossacarídeos transgalactosilados (TOS) e arabinoxilanoligossacarídeo (AXOS) (Macfarlane, Steed, e Macfarlane, 2008; Walton *et al.*, 2012). Recentemente, estudos em humanos foram conduzidos usando suplementação de AXOS, que resultou em aumento de populações bacterianas totais (Walton *et al.*, 2012). No Quadro 2 estão listados alguns prebióticos e seus efeitos na microbiota.

Quadro 2: Estudos com prebióticos e seus efeitos na microbiota intestinal (Adaptado de: Macfarlane, Steed, e Macfarlane, 2008).

Prebiótico	Tipo do estudo	Distribuição	Efeito na microbiota	Referências
GOS	12 voluntários e controle placebo	10g do prebiótico administrado diariamente por 8 semanas	Aumento da excreção fecal de bifidobactérias e <i>Lactobacillus</i> spp.	Ito <i>et al.</i> , 1990
GOS	12 voluntários	1,5g de prebiótico por dia por 3 semanas	Aumento de bifidobactérias nas fezes, redução dos números de <i>Clostridium</i> e <i>Bacteroides</i>	Ito <i>et al.</i> , 1993
TOS	8 voluntários	10g do prebiótico por 3 semanas	Aumento significativo de bifidobactéria nas fezes	Bouhnil <i>et al.</i> , 1997
GOS/FOS	90 bebês e controle placebo	4 ou 8 g/L com GOS de baixo peso molecular e FOS de alto peso molecular, por 28 dias	Aumento significativo de bifidobactérias	Alles <i>et al.</i> , 1999
GOS	30 voluntários e controle placebo	8,1g de xarope de GOS, GOS mais 3×10^{10} <i>B. lactis</i> Bb-12, ou 3×10^{10} <i>B. lactis</i> sem GOS por 3 semanas	Pouca alteração nas bifidobactérias fecais, observadas com GOS sozinho. GOS com <i>B. lactis</i> e <i>B. lactis</i> sozinho, resultaram em excreção fecal em números reduzidos de <i>B. longum</i>	Moro <i>et al.</i> , 2002
GOS/FOS	Ensaio duplo envolvendo 20 crianças com idades de 18 a 90 dias	0,8g/100mL de GOS/FOS por 6 semanas	Aumento da contagem total de bifidobactérias nas fezes. <i>B. adolescentis</i> , em comparação com os controles padrão de fórmula infantil, foi reduzido. Composição do gênero <i>bifidobacterium</i> em bebês que ingeriram os prebióticos foi semelhante a encontrada em bebês amamentados com <i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> e <i>B. longum</i>	Malinen <i>et al.</i> , 2002
GOS/FOS	42 prematuros, 15 placebos e um grupo de referência que recebeu leite materno fortificado	Alimentação suplementada com 10g/L da mistura dos prebióticos	Aumento de bifidobactérias em comparação com os níveis inicialmente baixos e também com controles não suplementados. Sem efeito significativo em <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> e <i>Enterobacteria</i> .	Haarman e Knol, 2005

No entanto, a maioria dos estudos de prebióticos em humanos concentrou-se no uso de GOS e FOS (Macfarlane, Macfarlane, e Cummings, 2006), e centralizaram-se principalmente na sua capacidade de promover grupos específicos de bactérias, incluindo bifidobactérias, que são promovidas por esses suplementos dietéticos, e em aumento da frequência de fezes e redução dos marcadores de inflamação (Fuller e Gibson, 1998; Bouhnik *et al.*, 2006).

Nos últimos 42 anos, estudos em humanos e animais vêm demonstrando que dietas ricas em fibras podem alterar o metabolismo mineral, especialmente quando fitato está presente. Esse fitato está presente em leguminosas, como o feijão, e é conhecido por se ligar aos minerais, como cálcio e ferro, impedindo que esses sejam absorvidos pelo organismo. As fibras atuam impedindo que esse fitato (que não foi retirado durante o processamento, como deixando esse alimento de molho) se ligue a esses minerais, melhorando a sua absorção (Sandstead, 1992). Isso também foi demonstrado em um estudo em animais, só que com fibras isoladas, como inulina e FOS. Estes compostos são fundamentais ao organismo humano porque o magnésio atua, por exemplo, participando de reações biológicas, e o cálcio é importante para a formação óssea e, com isso, evitar a osteoporose. Além disso, também foi demonstrado que esses prebióticos não só ajudam na absorção mineral pelo organismo, mas a sua adição na dieta, através da administração de um iogurte simbiótico (contendo FOS, inulina e *Lactobacillus acidophilus*), mostrou melhorar a viabilidade das bactérias probióticas no intestino humano (Rani e Srividya, 2016).

Os prebióticos do tipo inulina incluem: inulina, oligofrutose e FOS, cadeias de oligossacarídeos ou polissacarídeos compostos principalmente por moléculas de frutose ligadas que são bifidogênicas, ou seja, estimulam seletivamente o crescimento de bifidobactérias. São comercialmente disponíveis, podendo ser extraídos dos alimentos como, por exemplo, raiz de chicória, ou sintetizados a partir de uma molécula, como a sacarose (Kelly, 2008).

FOS são fibras dietéticas solúveis, denominados frutanos do tipo inulina que estão ligados por ligações glicosídicas de β - (2-1) frutossil-frutose. Isto torna o FOS resistente à hidrólise por enzimas digestivas do intestino delgado. Assim como a inulina (Kelly, 2008), o FOS também tem um efeito positivo, elevando os níveis de BDNF (Savignac *et al.*, 2013). A diferença do FOS para a inulina é, inicialmente, na produção e o número de unidades individuais de monossacarídeos. O FOS é sintetizado pela enzima fúngica β -

fructosidase, derivada de *Aspergillus niger*, por transfrutosilação, onde uma molécula de sacarose é hidrolisada e o radical frutossil é transferido para outra sacarose. Já no caso da inulina, o material vegetal inicial é, na maioria das vezes, raiz de chicória, pois contém grandes quantidades de frutanos do tipo inulina (Kelly, 2008).

FOS estão relacionados a estimulação seletiva do crescimento de bactérias da microbiota que favorecem a saúde do hospedeiro (Mao *et al.*, 2014), como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* (Gibson *et al.*, 2004), *B. fragilis*, *Clostridium butyricum* (Hidaka *et al.*, 1986; Hara *et al.*, 1994) e *Enterobacter cloacae* (Hartemink, Van Laere e Rombouts, 1997). Uma vez que FOS não é digerido no intestino delgado, a degradação dele é feita por estes grupos bacterianos anaeróbicos específicos do cólon, formando SCFAs como acetato, propionato e butirato que reduz o pH do cólon, deixando de ser alcalino (pH 8- 9) e passando a ser ácido, e isso melhora a absorção de íons minerais (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e nutrientes no corpo hospedeiro (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007; Tazoe *et al.*, 2008). Os efeitos dos SCFAs vão muito além de ajudar na absorção, eles também têm sido relatados tendo papel anti-inflamatório e anti-tumorigênicos (Säemann, 2000; Segain, 2000; Alva-Murillo, Ochoa-Zarzosa e Lopez-Meza, 2012; Tan, 2014).

Quando não há a formação de SCFAs, não há reconhecimento desses ácidos graxos pelos receptores de algumas células do sistema imunológico, como neutrófilos e monócitos, e isso vai liberar uma cascata de sinalização que vai desenvolver inflamação. Sendo assim, esses frutanos do tipo inulina são conhecidos também por terem esse efeito imunorregulador (Stewart, Timm e Slavin, 2008). A ingestão regular de FOS como parte da dieta melhora a saúde, fornecendo resistência contra os agentes patogênicos intestinais, favorecendo o crescimento da microbiota do cólon, além de todos os outros benefícios mencionados (Vos *et al.*, 2007; Delgado, Tamashiro e Pastore, 2010; Peshev e den Ende, 2014).

Um estudo de Forest e colaboradores, realizado em 2005, mostrou que FOS reduziu a incidência de tumor de cólon. Além disso, o FOS induziu especificamente uma diminuição na proporção de certas células do sistema imunológico que são consideradas células facilitadoras do tumor. As publicações sobre a suplementação de fibras em pacientes com câncer humano são raras e discutem, principalmente, a utilização de FOS, inulina ou a combinação desses prebióticos em misturas simbióticas usando *Lactobacillus* LGG e *Bifidobacterium lactis* Bb12; ou *Lactobacillus acidophilus* La5, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Roller *et al.*, 2007). Além disso, o tratamento

dietético com inulina e/ou FOS potencializou significativamente os efeitos de drogas citotóxicas e potencializou os efeitos da radioterapia na forma sólida de tumor linfóide transplantável (Vogt *et al.*, 2015). FOS também tem sido relacionado ao uso terapêutico no tratamento de IBD/IBS, onde Lindsay e colaboradores mostraram que FOS administrada de forma conjunta com inulina reduziu os sintomas de IBD em animais (Lindsay *et al.*, 2006).

Porém, existem resultados contraditórios a estes apresentados, porque apesar de ter todos esses efeitos benéficos com efeito anti-tumoral, há relatos que os frutanos tipo inulina podem aumentar a proliferação de adenomas (tipo de tumor benigno) (Vogt *et al.*, 2013). Além disso, FOS foi relacionado ao aumento do deslocamento de *Salmonella* e/ou dos seus produtos, do TGI para os sítios estéreis (Bruggencate, Tem e Bovee-oudenhoven, 2003). Esses dados mostram que FOS pode ter efeitos adversos no hospedeiro, dependendo das bactérias que entrem em contato com esse composto (Mao *et al.*, 2014).

Como foi observado, alguns prebióticos administrados em conjunto podem causar efeitos melhores assim do que quando separados, como: FOS administrado em conjunto com GOS são capazes de modificar o comportamento e a química do cérebro, sendo relevantes para ansiedade e depressão (Burokas *et al.*, 2016). Foi também descrito que FOS e GOS impedem os efeitos deletérios sobre o comportamento; influenciam na liberação de citocinas, induzida pela microbiota sob estresse; têm efeito na redução dos níveis de corticosterona plasmática (Schmidt *et al.*, 2015); reduziram a ansiedade; diminuíram os níveis elevados de BDNF no hipocampo (Savignac *et al.*, 2013).

Essas evidências sugerem que esses prebióticos utilizados foram metabolizados pelas bactérias, de forma que levaram a proliferação delas e, com isso, auxiliaram vários mecanismos do organismo do hospedeiro. Estes resultados de administração conjunta sugerem que uma mistura de dois prebióticos diferentes leva a mais possibilidades de estimulação de diferentes bactérias intestinais, se comparado à administração de apenas um prebiótico (Burokas *et al.*, 2016). Esse efeito constitui uma oportunidade para o desenvolvimento de produtos alimentares (Valdés-Varela *et al.*, 2016), podendo ser usados como ingredientes alimentares funcionais em bebidas, iogurtes e biscoitos (Kelly, 2008).

Sendo assim, a modulação da composição da microbiota intestinal pela

administração prebiótica pode ser uma forma adicional de reduzir os efeitos do estresse, uma vez que a microbiota e seus perfis específicos de biodiversidade no intestino influenciam, significativamente, nas medidas comportamentais, neuroquímicas e imunológicas, que são relevantes para o estresse relacionado com distúrbios psiquiátricos (Savignac *et al.*, 2013). Todos esses dados fornecem evidências adicionais de um papel benéfico dos prebióticos e seus efeitos no eixo microbiota-cérebro-intestino em saúde e em condições estressantes (Sarkar *et al.*, 2016).

Além disso, embora a maior parte das pesquisas tenham se concentrado na fermentação e na bifidogenicidade dos prebióticos, outros estudos têm mostrado que várias dessas substâncias imitam os receptores de superfície de células eucarióticas que as bactérias virulentas aderem como parte do processo de patogenicidade. Comprovando isso, o GOS foi visto inibindo a adesão de EPEC às células do hospedeiro e parecendo ser mais eficaz que FOS e inulina (Shoaf *et al.*, 2006). Também foi descoberto que TOS aprimorava as habilidades protetoras de *B. breve* em camundongos infectados com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Asahara *et al.*, 2001). Além dos efeitos antiaderentes de alguns oligossacarídeos, os CHOS de cadeia curta têm propriedades antibacterianas específicas. Porém, ainda não está claro as quantidades que são suficientes podem ser administradas a ponto de se observar alguns efeitos terapêuticos significativos (Sekiguchi *et al.*, 1994 *apud* Macfarlane, Steed e Macfarlane, 2008).

Porém, como já foi dito, há uma variação da microbiota entre os indivíduos e, com isso, também pode haver uma diferença na resposta dessas comunidades microbianas aos prebióticos. Portanto, as respostas não são universais e são influenciadas pela composição inicial da microbiota intestinal de um indivíduo (Ramirez-Farias *et al.*, 2009). No entanto, novos prebióticos continuam a ser desenvolvidos com base em oligossacarídeos sintéticos, incluindo oligossacarídeos de leite humano. Por exemplo, há interesse em desenvolver oligossacarídeos que compõem os açúcares l -fucose, d- glucose ou d- galactose, pois estes são o terceiro maior componente do leite humano (Yu *et al.*, 2013). Esse fato é importante porque uma das primeiras fontes de GOS foi o leite humano, que contém aproximadamente 7% de carboidratos, 90% dos quais compostos por lactose e uma variedade de oligossacarídeos à base de lactação, ou seja, novas formulações de prebióticos, que seriam mais digeríveis para o organismo do hospedeiro (Hunt *et al.* 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Alguns estudos vêm trazendo o conhecimento sobre como os microrganismos da microbiota, e a presença de prebióticos, pode interferir no crescimento de microrganismos com potencial de causar doenças no hospedeiro, como o *Clostridioides difficile*. Já foi observado que, na presença dos prebióticos inulina, FOS com inulina e frutooligossacarídeos, cepas de *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* e *B. animalis* subsp. *lactis*) têm a capacidade de inibir o crescimento de *C. difficile*, um importante agente de infecções associadas ao uso de antimicrobianos. Esse microrganismo tem sido alvo de inúmeros estudos por ser considerado um patógeno emergente, com cepas hipervirulentas e resistentes às fluoroquinolonas que são associadas a surtos epidêmicos. Assim, a avaliação da interferência de diferentes prebióticos no crescimento de espécies de clostrídeos componentes da microbiota, bem como na formação do biofilme, e na capacidade de inibir, nestas condições, o *C. difficile* pode contribuir para a proposição de terapias alternativas, como o emprego de prebióticos auxiliando microrganismos comensais no combate a esse patógeno.

3. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo principal avaliar a interferência de prebióticos no crescimento de espécies de clostrídeos componentes da microbiota intestinal humana e do enteropatógeno *Clostridioides difficile*, assim como na produção de biofilme por esses microrganismos.

Objetivos específicos:

- Avaliar o crescimento de cepas clínicas de *C. difficile* pertencentes aos ribotipos hipervirulento 027 e brasileiro 135 na ausência e presença dos prebióticos FOS, inulina e a combinação de ambos em diferentes concentrações;
- Avaliar o crescimento de duas espécies de clostrídeos da microbiota intestinal (*C. citroniae* e *C. scindens*) na ausência e presença dos prebióticos FOS, inulina e a combinação de ambos em diferentes concentrações;
- Avaliar a produção de biofilme pelas cepas *C. citroniae*, *C. scindens*, *C. difficile* ribotipos 027 e 135 em monocultivo de cada espécie e em combinação através de co-cultivo;
- Avaliar a produção de biofilme de *C. citroniae*, *C. scindens*, *C. difficile* em monocultivo de cada espécie e em combinação através de co-cultivo na presença de FOS combinado com inulina na concentração total de 1%.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cepas bacterianas e condições de cultivo

As cepas *Clostridium citroniae* (FM-V5-E) e *Clostridium scindens* (22-5-5 5 D6) (Antunes *et al.*, 2014) utilizadas nesse estudo, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Luis Caetano Martha Antunes (ENSP/FIOCRUZ). A cepa R20291 de *Clostridioides difficile* pertencente aos tipos 027/NAP1/B1 (genótipos *tcdA+*, *tcdB+*, deleção *tcdC+*, *cdt+*) foi isolada de um surto em Stoke Mandeville (Reino Unido) e foi fornecida pelo Dr Jon Brazier do Anaerobe Reference Laboratory (Cardiff/ Reino Unido) (Stabler *et al.*, 2009). A cepa SJ1 (genótipos *tcdA+*, *tcdB+*, deleção *tcdC-*, *cdt-*) de *C. difficile*, ribotipo 135, foi isolada no Brasil por nosso grupo de pesquisa (Balassiano *et al.*, 2010) e pertence a Coleção de Culturas do Laboratório de Biologia de Anaeróbios. As bactérias foram reativadas a partir do estoque armazenado a -20° C, em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI – Oxoid™, Cambridge, UK) pré-reduzido e esterilizado anaerobicamente (PRAS), suplementado com hemina (0,5 µg/mL - Sigma®) e menadiona (10 µg/mL- Sigma®), e incubadas por 24 horas a 37° C. Posteriormente, as culturas foram inoculadas em Agar Sangue Suplementado (ASS) com menadiona (10 µg/mL – Sigma®, St. Louis, MO, EUA) e hemina (0.5 µg/mL – Sigma®) e as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em câmara de anaerobiose (80% de N₂, 10% de H₂ e 10% CO₂) (Jousimies-Somer e Summanen, 2002).

4.2. Diluição dos prebióticos

Foram utilizados nesse estudo FOS (FOSVITA, Vitafor) e sachês contendo 12 g de inulina produzidos em farmácia de manipulação (Naturativa). Foram realizadas diferentes tentativas de preparo e esterilização dos prebióticos, tanto individualmente como em conjunto. Com isso, os prebióticos FOS, inulina e a combinação de ambos foram diluídos em caldo *Brucella* esterilizado, de forma a obter a concentração total de 8% (p/v). Em seguida, foi realizada a autoclavação e posterior filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm (KASVI).

4.3. Avaliação da interferência dos prebióticos na curva de crescimento

Para a avaliação do crescimento bacteriano na presença dos prebióticos utilizados

nesse estudo, as cepas *C. citroniae* (22-5-5 5 D6), *C. scindens* (FM-V5-E) e *C. difficile* (R20291 027 e SJ1 135) foram cultivadas em caldo Brucella, suplementado com menadiona (10 µg/mL - Sigma®) e hemina (0,5 µg/mL - Sigma®), e incubadas em câmara de anaerobiose por 24 horas a 37° C (Jousimies-Somer e Summanen, 2002). Após o período de incubação, os cultivos foram ajustados para uma concentração de 10⁸ UFC/ml (equivalente a escala 0.5 de McFarland). O volume de 20 µL foi inoculado em 180 µL de caldo Brucella puro ou contendo diluições de prebióticos variando de 1% a 8% em microplaca de 96 poços. Foram realizadas as seguintes condições de cultivo: 1) meio com FOS e bactéria, 2) meio com inulina e bactéria, 3) meio com FOS, inulina e bactéria e 4) meio apenas com bactéria. Como controles foram utilizados o caldo Brucella puro e contendo cada concentração dos prebióticos. Uma vez que a câmara de anaerobiose é um ambiente com baixa umidade, nos poços mais externos foram adicionados 200 µL de água para evitar a evaporação do meio de cultura (Figura 2). Em seguida foi realizada a incubação por 24 horas a 37°C, em câmara de anaerobiose. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As leituras foram realizadas a cada 1h em leitor de ELISA (Infinite[®] F50– TECAN) utilizando a densidade optica de 620nm (DO₆₂₀) por 24 horas.

4.4. Biofilme

4.4.1. Avaliação da produção de biofilme em condições de monocultivo e co-cultivo

As cepas bacterianas utilizadas nesse estudo foram reativadas conforme descrito no item 4.1. As bactérias foram inoculadas na proporção de 1:100 (controle: 2 µL de cada bactéria em 198 µL de meio de cultura. Nas condições de co-cultivo: 2 µL de cada bactéria em 196 µL de meio de cultura), em triplicata, em microplaca de 96 poços contendo BHI com 0,5% de glicose (p/v). Em seguida as placas foram incubadas em câmara de anaerobiose (80% de N₂, 10% de H₂ e 10% CO₂) por 72 horas a 37° C.

Após a incubação, o meio presente nos poços foi descartado e foram realizadas, duas lavagens com 200 µL de PBS estéril 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2), para a retirada das células não aderidas ao biofilme. A placa foi incubada a 37° C por 10 minutos e 200 µL de Cristal Violeta 0,2% (p/v) adicionados em cada poço. Posteriormente foi realizada incubação a 37° C

por 30 minutos. O Cristal Violeta foi retirado e os poços lavados duas vezes com PBS estéril 1X, para a retirada do excesso do corante. Em seguida, foram adicionados 200 μL de uma solução de 20% acetona e 80% etanol (v/v) e a leitura realizada em leitor de ELISA utilizando a DO de 570nm (DO_{570}). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Para classificação da produção de biofilme, foi considerado como forte produtor de biofilme, as cepas que apresentaram uma $\text{DO} \geq 2$; como produtor moderado, $1 \geq \text{DO} < 2$; baixo produtor, e baixo produtor com $\text{DO} < 1$ (Santos *et al.*, 2017).

4.4.2. Avaliação da produção de biofilme em condições de monocultivo na presença de prebióticos

As cepas bacterianas foram cultivadas conforme descrito no item 4.1 e a concentração dos prebióticos foi determinada após análise dos resultados das curvas de crescimento. As bactérias foram inoculadas na proporção de 1:100 (2 μL do crescimento bacteriano em 198 μL) em triplicata, em microplaca de 96 poços contendo BHI com 0,5% de glicose (p/v) puro ou com a mistura de FOS com inulina. Em seguida as placas foram incubadas em ambiente de anaerobiose (jarras de acrílico e gerador de anaerobiose ($\text{H}_2 + \text{CO}_2$) Anaerobac, Probac) ou em jarra de anaerobiose a 37° C por 72 horas. A bactéria *S. epidermidis* ATCC 35984, foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura puro e contendo os prebióticos. Após a incubação, foi realizado o procedimento para análise da produção de biofilme conforme descrito acima.

4.4.1. Análise estatística

Para analisar a média de crescimento bacteriano em cada condição, foi utilizado o programa Graphpad Prisma 5 e, para avaliar as diferenças entre o crescimento da bactéria em cada situação, foi realizado o teste ANOVA (comparações múltiplas), seguido pelo teste de comparação de média SNK (Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Para analisar a média de formação de biofilme bacteriano na condição com e sem prebiótico, foi utilizado o aparelho de ELISA (SoftMax pro 5.4.1) e, para avaliar as diferenças entre a produção de biofilme da bactéria em cada situação, foi realizado teste t, seguido pelo teste de comparação de média SNK (Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento de *C. difficile* (cepas R20291 027 e SJ1 135), *C. scindens* e *C. citroniae* foram realizadas em dias diferentes. O crescimento dessas bactérias foi avaliado em quatro concentrações de prebióticos (1%, 2%, 4% e 8%) e em quatro condições diferentes: na presença de 1) FOS, 2) inulina, 3) FOS com inulina e 4) somente o meio de cultura.

Nas curvas obtidas para a cepa de *C. difficile* SJ1, ribotipo 135, o maior crescimento foi apresentado no controle positivo, em meio de cultura puro, não sendo observada diferença significativa com o crescimento obtido nas concentrações de 1% em todas as condições ($p=0,594$, teste t) e na condição somente com inulina na concentração de 2% ($p=0,354$, teste t). No entanto, foi observada uma redução ou ausência do crescimento bacteriano nas concentrações de 4% e 8% ($p<0,021$, teste t) (Figura 1).

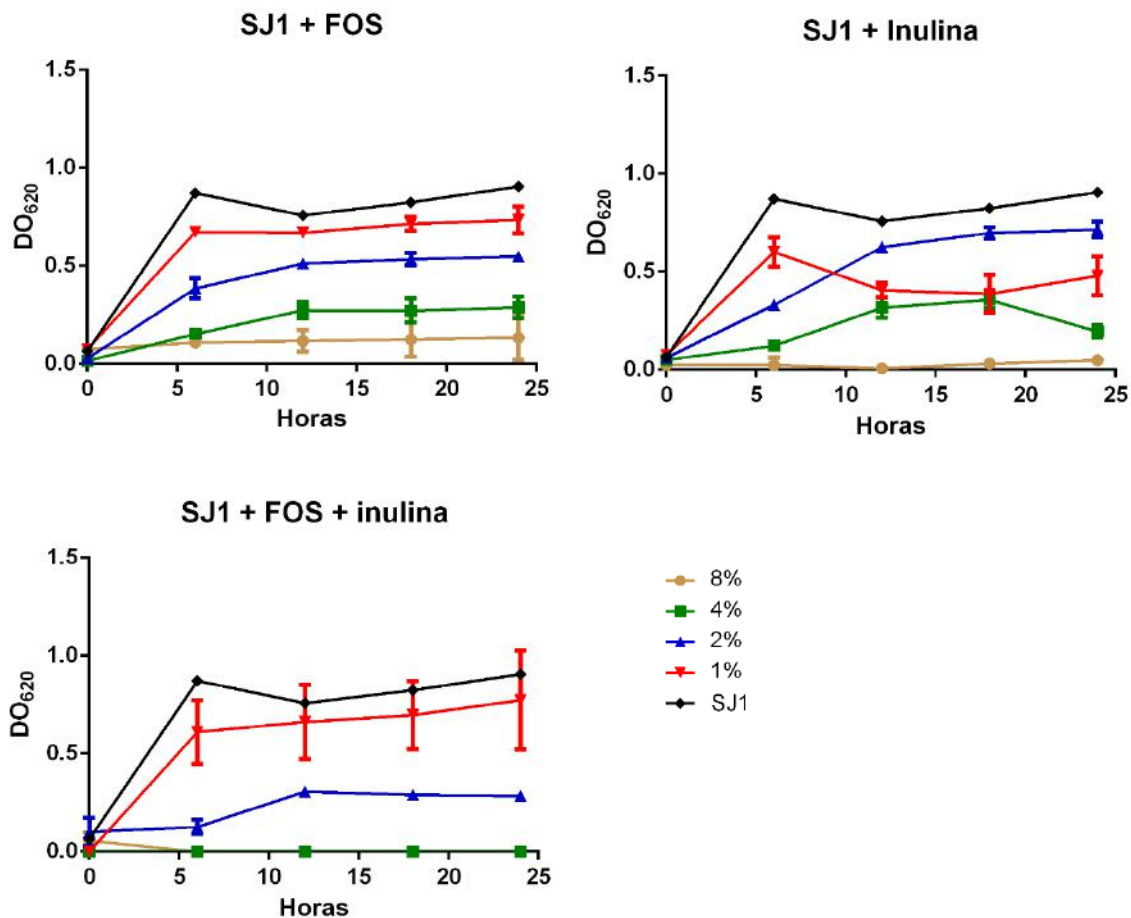


Figura 1: Curva de crescimento de *C. difficile* SJ1 135 na ausência e na presença dos prebióticos: inulina, FOS e FOS com inulina.

O mesmo resultado de inibição do crescimento foi observado no crescimento da cepa de *C. difficile* R20291 (ribotipo 027). Nas condições de crescimento somente com inulina ou somente com FOS, foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,038$, teste t) quando o crescimento era comparados ao controle, com exceção do crescimento com 4% de inulina ($p = 0,134$, teste t). Na condição de FOS com inulina, para todas as concentrações foram detectadas diferenças significativas quando comparadas ao controle ($p < 0,009$, teste t) (Figura 2). No entanto, como em todas as curvas foi detectado um fraco crescimento do controle positivo (meio puro), estes ensaios serão repetidos futuramente para fins de confirmação deste padrão de comportamento.

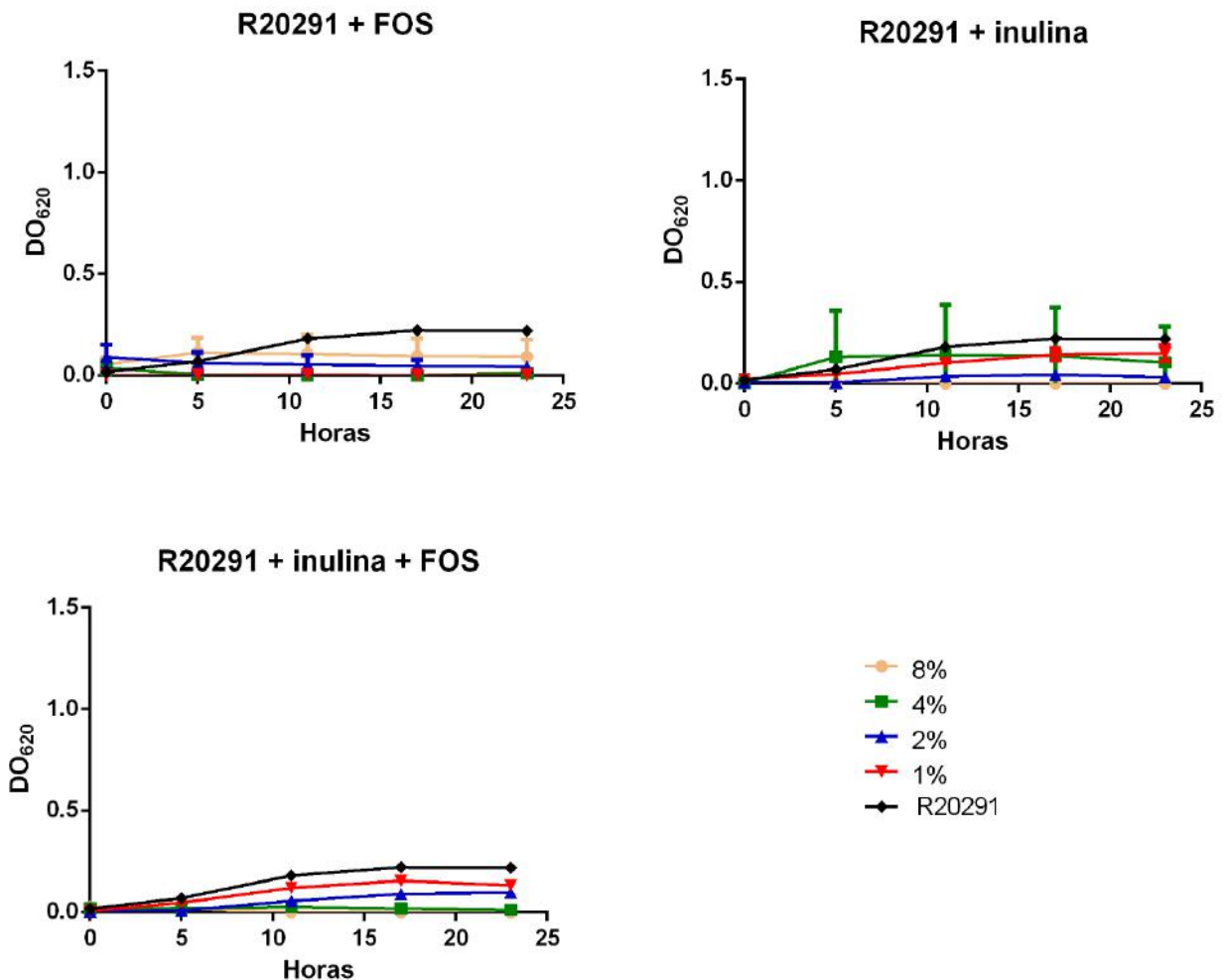


Figura 2: Curva de crescimento de *C. difficile* R20291 na ausência e na presença dos prebióticos: A) inulina, B) FOS e C) FOS com inulina.

Foi observado que *C. citroniae* apresentou crescimento sem diferença significativa ($p=0,147$, teste t) em relação ao controle, na concentração de 1% de prebióticos em todas as condições e de 2% de FOS com inulina ($p=0,109$, teste t). Nas demais concentrações em todas as condições foi observada redução do crescimento ($p<0,015$, teste t), se comparado ao controle. Sendo assim, é possível inferir também que o tempo de crescimento desta bactéria nas concentrações de 2%, 4% e 8% foi alterado mostrando que, nestas concentrações, o crescimento foi mais lento do que observado na curva controle (só meio de cultura e *C. citroniae*) (Figura 3).

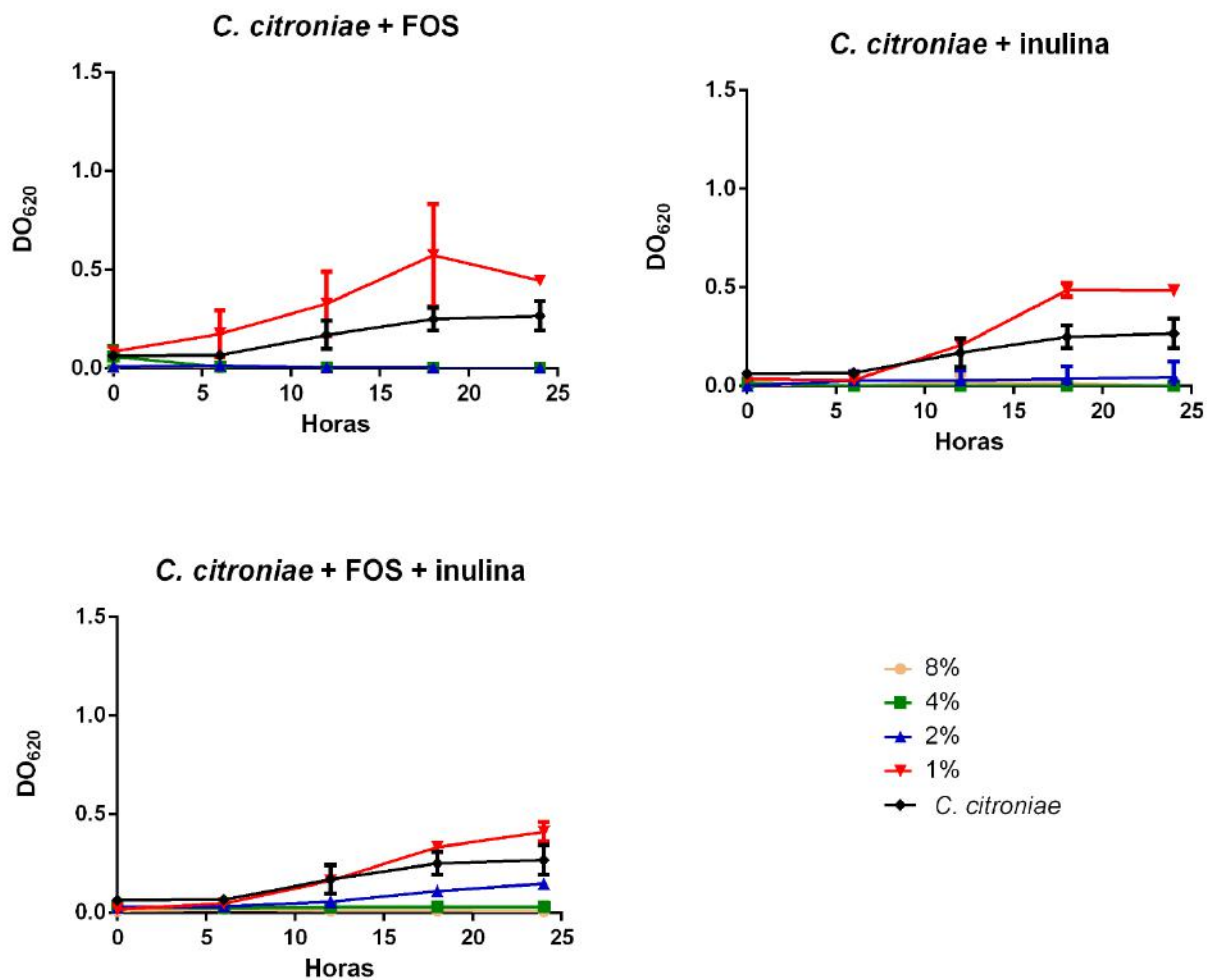


Figura 3: Curva de crescimento de *C. citroniae* na ausência e na presença dos prebióticos: inulina, FOS e FOS com inulina nas concentrações de 1%.

As curvas de *C. scindens* com os prebióticos apresentaram tempos iniciais divergentes do controle em todas as condições e concentrações, o que pode indicar erro na diluição ou na execução da técnica. Isso foi confirmado através da análise estatística da curva feita em cada concentração, comparadas ao controle, mostrando diferença significativa ($p < 0,015$, teste t) para os tempos “zero”. Desta forma, não foi possível considerar os resultados encontrados. Além deste aspecto, o perfil das curvas revelou quase nenhum crescimento de *C. scindens* no controle e nas concentrações testadas (Figura 4). Esses ensaios serão repetidos futuramente.

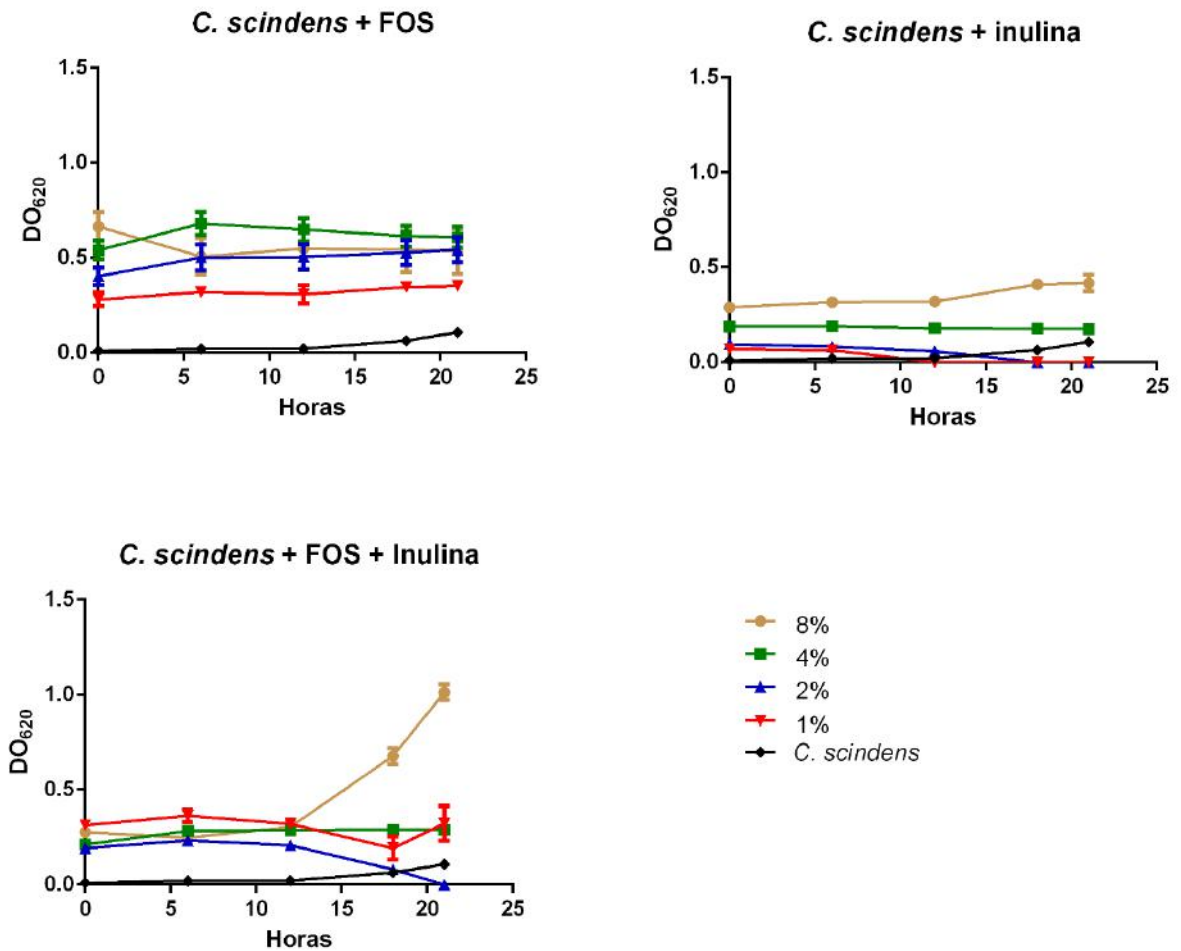


Figura 4: Curva de crescimento de *C. scindens* na ausência e na presença dos prebióticos: inulina, FOS e FOS com inulina.

5.2. Biofilme

Antes de avaliar se o prebiótico iria interferir na formação de biofilme pelas espécies bacterianas estudadas, foram realizados ensaios para avaliação deste exopolímero no meio de cultura puro. Estes testes foram realizados em câmara de anaerobiose. Após a leitura da microplaca de 96 poços foi notado que, segundo a classificação descrita no item 4.4, a cepa de *C. difficile* R20291 era forte produtora de biofilme; a cepa de *C. difficile* SJ1 135 era produtora moderada, e que as cepas de *C. citroniae* e de *C. scindens* eram fracas produtoras de biofilme (Figura 5).

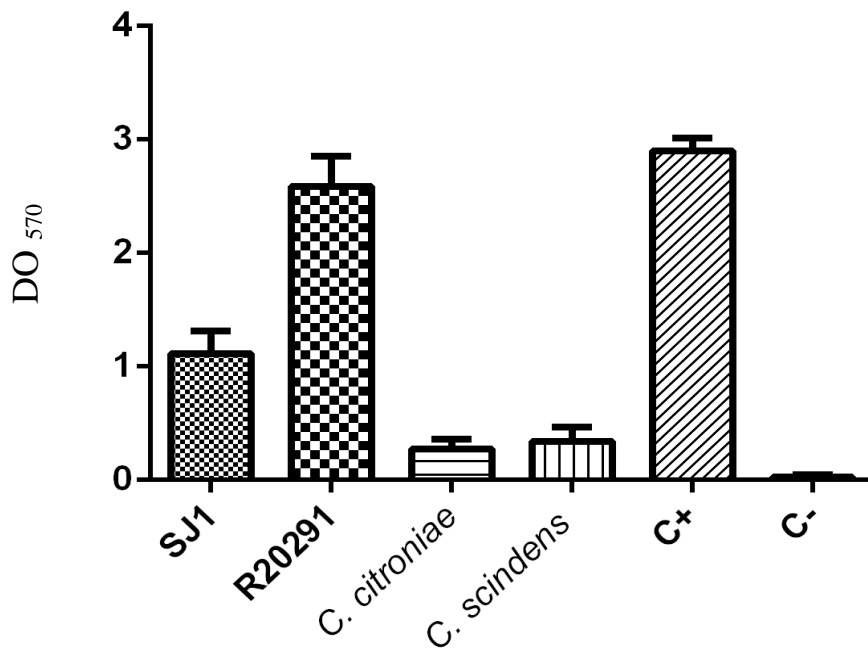


Figura 5: Biofilme feito na câmara de anaerobiose com as bactérias do presente estudo. C +: Controle positivo (*S. epidermidis* ATCC 35984). C -: somente BHI.

Essa produção de biofilme também foi avaliada em condições de co-cultivo, sem a presença dos prebióticos. A cepa de *C. difficile* SJ1 135 mostrou redução significativa ($p=0,019$, teste t) na produção de biofilme quando em contato com *C. citroniae*, mas não mostrou diferença significativa ($p=0,157$, teste t) quando em contato com *C. scindens*. A cepa de *C. difficile* R20291 não apresentou diferença significativa na produção de biofilme tanto na presença de *C. citroniae* ($p=0,766$, teste t) quanto de *C. scindens* ($p=0,463$, teste t). Com relação as bactérias da microbiota, *C. scindens* e *C. citroniae*, foi observada diferença

significativa ($p < 0,049$, teste t) na produção de biofilme quando as duas foram co-cultivadas (Figura 6).

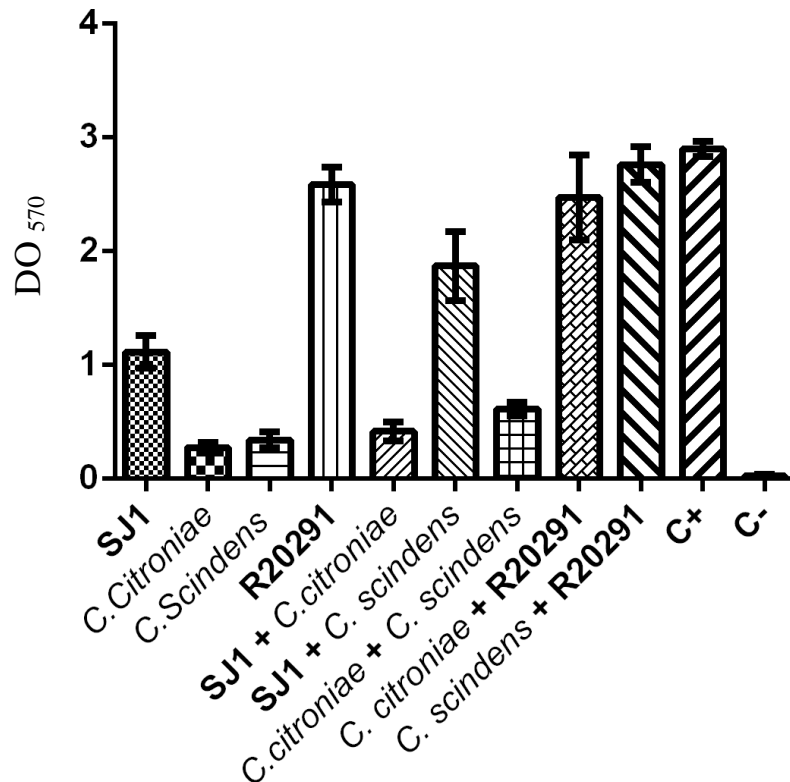


Figura 6: Avaliação da produção de biofilme quando em co-cultivo e sozinhas. * Diferença significativa ($p < 0,05$). C +: controle positivo (*S. epidermidis*). C -: controle negativo (somente meio de cultura).

Após analisar os resultados de interferência no crescimento pelos prebióticos, foi selecionada a concentração e condição de 1% dos prebióticos FOS com inulina, para realização dos ensaios de biofilme, uma vez que esta não foi capaz de interferir tanto no crescimento. Para verificar se houve alteração na produção de biofilme após 72 horas, esse teste foi feito em microplaca de 96 poços, porém em jarra de anaerobiose. Após o tempo de incubação só foi possível detectar DO_{570} abaixo de 0,15 para todas as cepas e condições, inclusive para o controle positivo de *S. epidermidis* (Figura 7). Estes ensaios serão novamente realizados no futuro.

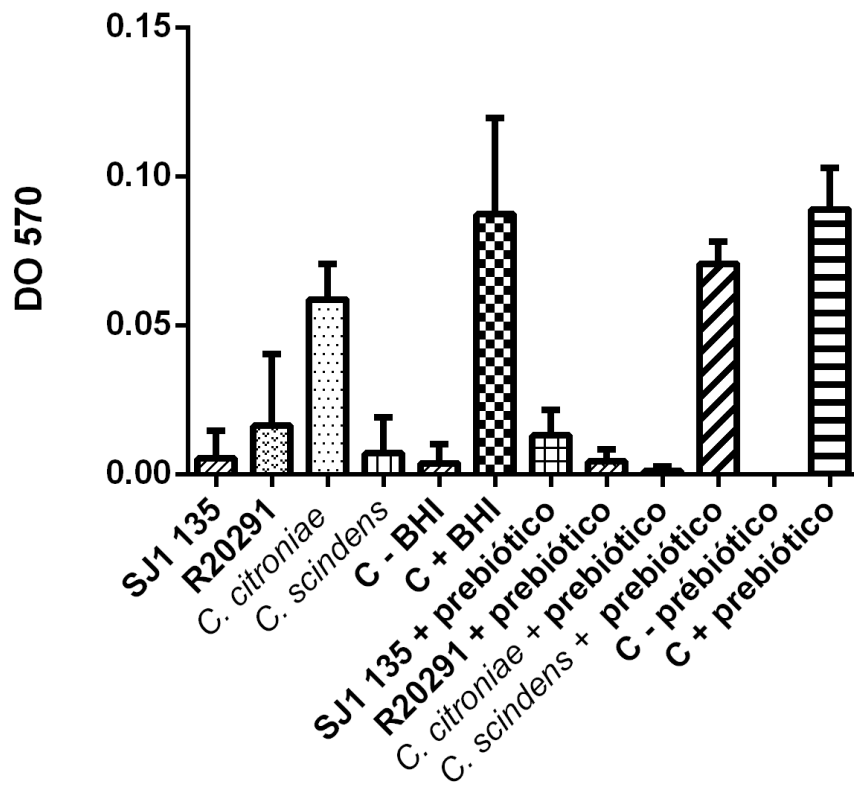


Figura 7: Comparação da produção de biofilme com e sem prebiótico feita pelas bactérias do estudo feito em jarra de anaerobiose. C+: controle positivo (*S. epidermidis*). C -: controle negativo (somente BHI).

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm contribuído no entendimento das infecções decorrentes de disbioses, como as CDIs, e terapias alternativas que tenham a capacidade de reestabelecer a microbiota tem sido propostas. Dentre estas está a utilização de probióticos e alguns já estão disponibilizados para o tratamento de distúrbios inflamatórios intestinais (Meydani e Há, 2000; Klaenhammer, 2000). Além disso, probióticos também tem sido empregados no tratamento de diversas doenças como artrite (Baharav *et al.*, 2004), diarreia associada a antimicrobianos (Kim, Camilleri e Mckinzie, 2003) e doença de Crohn (Schultz *et al.*, 2004).

Um estudo recente realizado por Rani e Srividya, em 2016, demonstrou que simbióticos podem ter um efeito significativo na proteção a algumas doenças, e, que isto pode se dar indiretamente pela melhora do estado nutricional do paciente. Neste trabalho os autores desenvolveram iogurte simbiótico com baixo teor de gordura e com funcionalidades mais aprimoradas (Rani e Srividya, 2016). Um simbiótico contendo GOS, FOS e *Bifidobacterium breve* M16-V foi estudado por Ceapa e colaboradores em 2013 e os autores verificaram uma capacidade de redução na severidade de dermatite atópica em um subgrupo de camundongos recém-nascidos com níveis elevados de IgE (que está relacionado a ocorrência de, principalmente, alergia), sugerindo que, se feita a intervenção no início da vida, os efeitos são observados a longo prazo (Ceapa *et al.*, 2013).

Em 2017, Rätsep e colaboradores demonstraram que a administração de um simbiótico (*L. plantarum* com xilitol) era capaz de inibir a germinação de esporos de *C. difficile*, reduzindo, conseqüentemente, a colonização intestinal em modelo animal (Rätsep *et al.*, 2017). Os simbióticos compostos por *B. longum* IPLA20022 e *B. breve* IPLA20006 combinados com FOS e inulina (Synergy™) ou FOS (Actilight®) já haviam sido propostos, a partir de resultados obtidos em ensaios *in vitro*, como os mais promissores para a redução de CDI (Valdés-Varela *et al.*, 2016).

É fato que alterações nestas formulações levam a resultados distintos (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007) e apesar de, na maioria das vezes, a administração de simbióticos determinar resultados mais favoráveis do que a administração isolada de probióticos ou prebióticos, resultados promissores também tem sido encontrados com apenas um destes grupos (Gopal, Prasad e Gill, 2003). DeWulf e colaboradores demonstraram que os prebióticos promoveram o

crescimento de bifidobactérias e também estimularam o de *Faecalibacterium prausnitzii*, uma espécie reconhecida como sendo componente da microbiota intestinal normal de indivíduos saudáveis, sendo esta intervenção benéfica para pacientes com IBD devido aos seus efeitos anti-inflamatórios (Sokol *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2007; Martinez-Medina *et al.*, 2006). O uso de prebióticos também já foi associado a redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares, como diabetes e obesidade (Slavin, 2013). Com isso, a necessidade de identificar novos microrganismos que respondam a administração de prebióticos é de grande interesse para retardar ou impedir a ocorrência de algumas doenças, como as mencionadas, favorecendo o bem-estar e a manutenção da saúde no hospedeiro.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a interferência dos prebióticos FOS e inulina, de maneira individual e conjunta, no crescimento de duas espécies bacterianas pertencentes a microbiota intestinal humana, *C. citroniae* e *C. scindens*, e no crescimento de uma espécie patogênica ao homem, *C. difficile*, sendo incluídas no estudo uma cepa pertencente ao ribotipo 027 (R20291), caracterizada como hipervirulenta e epidêmica, e uma cepa que pertence ao ribotipo prevalente em surtos no Brasil, denominado 135 (cepa SJ1).

De maneira geral, as cepas de *C. difficile*, pertencentes ao ribotipo hipervirulento 027 e o ribotipo brasileiro 135 apresentaram comportamento similar frente aos prebióticos. Foi observada uma redução ou ausência do crescimento bacteriano nas concentrações de 4% e 8% para os probióticos testados isoladamente ou em conjunto, o que parece ser um dado a ser considerado na busca de substâncias que possam inibir ou controlar as CDIs. Em um estudo realizado por Valdés-Varela e colaboradores, em 2016, foi observado que a cepa de *C. difficile* LMG21717 ribotipo 001 (produtora de TcdA e TcdB), um dos mais comuns na Europa, não conseguiu crescer na presença de inulina a 2%, ratificando a capacidade deste prebiótico de interferir negativamente no crescimento do patógeno. Por outro lado, nesse mesmo estudo, *C. difficile* apresentou crescimento significativamente aumentado ($p < 0,05$) quando co-cultivado com *B. breve*, na presença de inulina, indicando a existência de múltiplas variáveis na modulação da relação de uma bactéria com o substrato quando isolada ou como componente de um consórcio microbiano. Estes dados atentaram para a inclusão nesta discussão das relações bactéria-bactéria (Valdés-Varela *et al.*, 2016).

Vale, no entanto, ressaltar que os resultados obtidos para o crescimento da cepa hipervirulenta R20291, do ribotipo 027, devem ser checados tendo em vista o pouco

crescimento detectado para o controle positivo, quando a cepa foi cultivada em meio puro, sem prebiótico. Esse fato pode ter sido ocasionado por erros no preparo do inóculo ou na incubação das microplacas e novos ensaios serão realizados para fins de confirmação do efeito inibitório observado.

Os resultados encontrados para a cepa de *C. scindens* estudada não permitiram análises tendo em vista possíveis erros de ajuste nos inóculos das curvas de crescimento. Estas serão novamente realizadas. Greathouse e colaboradores, em 2015, mostraram a importância de se estudar mais essa espécie, ao observar que esta sozinha ou em combinação com outras espécies bacterianas, ajudava a restaurar os níveis de ácido desoxicólico, protegendo, assim, contra o estabelecimento de CDIs (Buffie *et al.*, 2015; Greathouse, Harris e Bultman, 2015). Essas conclusões também são suportadas por dados de Theriot e colaboradores, que em 2014, já haviam demonstrado a diminuição dos ácidos biliares secundários após tratamento antibiótico em camundongos (Theriot *et al.*, 2014). Desta forma, a proposição de uma interferência com prebióticos que estimulem *C. scindens* e inibam *C. difficile* pode ser muito promissora.

Já para a cepa de *C. citroniae* testada, não foram encontradas concentrações dos prebióticos que estimulasse o seu crescimento. Em algumas condições a espécie teve o crescimento reduzido quando comparado ao controle, como nas concentrações de 4% e 8% de todas as condições. A concentração de 1% foi favorável ao crescimento bacteriano em todas as condições, assim como a de 2 % de FOS com inulina, sendo equiparadas ao controle. A espécie *C. citroniae* já foi relacionada a repressão do sistema de secreção tipo III de *Salmonella* (utilizado para introduzir os fatores de virulência nas células hospedeiras), sendo inferido uma interferência do tipo anti-virulência (Antunes *et al.*, 2014). Essa relação de autoproteção, da microbiota ter evoluído para produzir certos metabólitos com papel anti-virulência, para proteger seu nicho contra intrusos, como *Salmonella*, pode funcionar de forma inversa também, ou seja, esses patógenos também podem ter desenvolvido a capacidade de detectar metabólitos da microbiota intestinal, garantindo que os genes de virulência sejam expressos no momento e local corretos durante a infecção (Vogt e Finlay, 2017). Mesmo que esse microrganismo aparentemente não seja sensível a presença dos prebióticos testados, como o *C. difficile*, não pode ser descartada a possibilidade de que este seja capaz de produzir algum composto que afete a virulência desse patógeno, como ocorre com a *Salmonella*. Sendo assim, seria interessante avaliar o comportamento do patógeno na presença dos metabólitos, assim como das bactérias destas espécies.

Nesse estudo também foi avaliada a produção de biofilme por essas bactérias sozinhas e em condições de co-cultivo e também se a presença de prebióticos poderia influenciar na expressão destes exopolímeros.

Foi possível categorizar a cepa R20191 (ribotipo 027 hipervirulento) como forte produtora de biofilme; SJ1 (ribotipo brasileiro 135) como produtora moderada e as cepas de *C. citroniae* e *C. scindens* como são fracas produtoras sem a presença dos prebióticos. Santos, em 2017 e Dapa e colaboradores, em 2013, já haviam descrito a elevada produção de biofilme pelo ribotipo 27 (Dapa *et al.*, 2013; Santos, 2017).

Ensaio de co-cultivo foram realizados na tentativa de mimetizar, mesmo que minimamente, o ambiente com vários microrganismos no intestino humano. A cepa de *C. difficile* SJ1, ribotipo 135, mostrou redução na produção de biofilme quando em contato com *C. citroniae*, mas não mostrou diferença quando estava em contato com *C. scindens*. A cepa de *C. difficile* R20291, ribotipo 027, por sua vez, não apresentou diferença significativa na produção de biofilme tanto na presença de *C. citroniae* quanto de *C. scindens*. Com relação as bactérias da microbiota, *C. scindens* e *C. citroniae*, foi observada diferença na produção de biofilme quando as duas foram co-cultivadas. É fato que para ter certeza de que essas relações ocorrem de fato, esses testes devem ser repetidos e os protocolos devem ser ajustados para checar o efeito do sobrenadante das bactérias da microbiota e o inóculo das bactérias patogênicas do estudo, pois é a metodologia indicada para esse tipo de teste (Khosravi *et al.*, 2014).

Após os resultados das curvas de crescimento, foi possível estabelecer a concentração de 1% de FOS com inulina como a mais adequada para ser usada nos ensaios de interferência dos prebióticos na produção de biofilme ao se considerar que as concentrações mais elevadas inibiram o crescimento dos clostrídeos patogênicos. No entanto, os resultados destas análises não puderam ser considerados tendo em vista que nem os controles positivos expressaram biofilme. Estes ensaios terão que ser repetidos com atenção as condições de incubação. Os experimentos realizados em uma primeira etapa somente na presença de meio de cultura (figura 7), foram executados em câmara de anaerobiose, sendo observado que todas as cepas eram produtoras de biofilme, respeitando a classificação feita em cada uma. A discrepância dos resultados encontrados na etapa de avaliação da interferência dos prebióticos na produção de biofilme (Figura 9) pode ser decorrente da realização destes empregando métodos descontínuos de incubação, sendo utilizadas jarras de anaerobiose. Nas jarras o gerador de

anaerobiose pode demorar um certo tempo para deixar o ambiente livre de oxigênio e assim bactérias mais susceptíveis aos danos causados pelas moléculas reativas de oxigênio podem ter sua viabilidade e expressão gênica comprometida.

Por fim, os resultados preliminares encontrados no presente projeto sugerem a possível interferência destes no crescimento de *C. difficile* e justificam a continuidade deste estudo. É fato que os prebióticos, probióticos e simbióticos surgem atualmente como potenciais formas de prevenir e/ou tratar infecções associadas a disbioses e o delineamento de novas propostas terapêuticas poderá surgir do conhecimento do efeito destes em patógenos e em componentes da microbiota intestinal.

7. CONCLUSÃO

- Houve redução do crescimento de cepas de *C. difficile* pelos prebióticos testados nas concentrações de 4 e 8%. A concentração de 1% dos prebióticos testados mostraram crescimento de *C. citroniae* semelhante ao controle positivo;
- Cepas de *C. difficile* testadas foram categorizadas como produtora forte (cepa R20291, ribotipo hipervirulento 027) e moderada de biofilme (cepa SJ1, ribotipo brasileiro 135). As cepas de *C. citroniae* e *C. scindens* foram categorizadas como fracas produtoras de biofilme pelo método utilizado;
- A cepa de *C. difficile* SJ1, ribotipo 135, mostrou redução na produção de biofilme quando co-cultivada com *C. citroniae*, o que não foi observado para *C. scindens*. Para a cepa de *C. difficile* R20291, ribotipo 027 hipervirulento não foi observada alteração na produção de biofilme tanto na presença de *C. citroniae* quanto de *C. scindens*;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlerberth, I. e Wold, A.E. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Pediatric, International Journal of Pediatrics*, 98(2), 229–238.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Vilpponen-salmela, T., Mattila-sandholm, T. e Wright, A.Von. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 351–354.
- Alcides, A.P.P., Brazier, J. S., Pinto, L.J.F., Balassiano, I.T., Boente, R.F., Paula, G.R., Ferreira, E.O., Avelar, K.E.S., Miranda, K.R., Ferreira, C.S. e Domingues, R.M.C.P. (2007). New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 92(1), 53–59.
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A. e López-Meza, J.E. (2012). Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Veterinary Microbiology*, 155(2–4), 324–331.
- Alvaro, E., Andrieux, C., Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Lepercq, P., Sutren, M., Galan, P., Duval, Y., Juste, C. e Doré, J. (2007). Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt. *British Journal of Nutrition*, 97(1), 126.
- An, D., Danhorn, T., Fuqua, C. e Parsek, M.R. (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103(10), 3828–3833.
- Antunes, L.C.M., Mcdonald, J.A.K., Schroeter, K., Carlucci, C., Ferreira, R.B.R., Wang, M., Yurist-Doutsch, S., Hira, G., Jacobson, K., Davis, J., Allen-Vercoe, E. e Brett, B. (2014). Antivirulence Activity of the Human Gut Metabolome. *mBio*, 5(4), e01183-14.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. L., Batto, J., Bertalan, M., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Poten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium., Weissenbach, W., Ehrlich, D. e Bork, P. (2013). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180.
- Baharav, E., Mor, F., Halpern, M. e Weinberger, A. (2004). *Lactobacillus* GG Bacteria Ameliorate Arthritis in Lewis Rats. *Journal of Nutrition*, 134, 1964–1969.
- Bailey M.T., Dowd S.E., Galley J.D., Hufnagle A.R., Allen R.G. e Lyte M. (2011). Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, Behavior and Immunity*, 25, 397-407.
- Balassiano, I.T., Santos-filho, J., Pinto, M., Oliveira, B. De, Catarina, M., Japiassu, A.M., Reis, A.M., Brazier, J.S., Ferreira, E.O. e Pilotto, C. (2010). An outbreak case of *Clostridium difficile* -associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(4), 449–455.
- Barrett, E., Ross, R.P., O’Toole, P.W., Fitzgerald, G.F. e Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 411–417.
- Belizário, J.E. e Napolitano, M. (2015). Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–16.
- Bella, S. Di, Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N. e Masi, A. (2016). *Clostridium difficile* Toxins A and B : Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects, *Toxins*, 8(5), 134.

- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, D.K., Verdu, F.E. e Collins, S.M. (2011). The intestinal microbiota affects central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*, 141(2), 599–609.
- Best, E.L., Fawley, W.N., Parnell, P. e Wilcox, M.H. (2010). The Potential for Airborne Dispersal of *Clostridium difficile* from Symptomatic Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 50(11), 1450–1457.
- Betriu, C. e Picazo, J.J. (2010). El papel de los anaerobios en patología infecciosa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(3), 141–143.
- Blaut, M. e Klaus, S. (2012). Intestinal microbiota and obesity. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 209(1), 251–273.
- Borre, Y.E., O’Keefe, G.W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G. e Cryan, J.F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: Implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 509–518.
- Borriello, S.R., Davies, H.A., Kamiya, S., Reed, P.J. e Seddon, S. (1990). Virulence factors of *Clostridium difficile*. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(2). In *International Symposium on Anaerobic Bacteria and Bacterial Infections*. pp. S185-S191
- Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Paineau, D. e Bornet, F. (2006). The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutrition Journal*, 5(1), 8.
- Brandt, L.J., Aroniadis, O.C., Mellow, M., Kanatzar, A., Kelly, C., Park, T., Stollman, N., Rohlke F. e Surawicz, C. (2012). Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *American Journal of Gastroenterology*, 107(7), 1079–1087.
- Browne, H.P., Forster, S.C., Anonye, B.O., Kumar, N., Anne, B., Stares, M.D., Goulding, T. e Lawley, T.D. (2016). Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*, 533(7604) 543-546.
- Bruggencate, S.J.M., Ten, Bovee-oudenhoven, I.M.J., Lettink-wissink, M.L.G. e Meer, R. Van Der. (2003). Dietary Fructo-Oligosaccharides Dose-Dependently Increase Translocation of *Salmonella* in Rats. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2313–2318.
- Brunser, O. e Gotteland, M. (2010). Prebiotics and probiotics in human health: an overview. In: *Bioactive foods in health promotion: probiotics and prebiotic*. Watson, R. e Preedy, V., Ed. (Kidlington: Academic press), pp 73-93.
- Buffie, C.G., Bucci, V., Stein, R.R., Mckenney, P.T., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Liu, H., Kinnebrew, M., Viale, A., Littmann, E., Brink, M.R.M.V.D., Jenq, R.R., Taur, Y., Sander, C., Cross, J., Toussaint, N.C., Xavier, J.B. e Dartmouth, N. (2015). Precision microbiome restoration of bile acid-mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*, 517(7533), 205–208.
- Burke, K.E. e Lamont, J.T. (2014). *Clostridium difficile* infection: A worldwide disease. *Gut and Liver*, 8(1), 1–6.
- Burokas, A., Arboleya, S., Rachel, D., Peterson, V.L., Murphy, K., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G. e Cryan, J.F. (2016). Targeting the microbiota-gut-brain axis: prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. *Biological Psychiatry*, 1–16.
- Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Van Meerveld, B.G. e Verne, G.N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology & Motility*, 24: 503–512.
- Carlier, J., Bedora-faure, M., Alauzet, C. e Mory, F. (2010). Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Séguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov., and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 585-590

CDC (2015). Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/>. Acesso em: 12/11/2017.

Ceapa, C., Wopereis, H., Rezaiki, L., Kleerebezem, M., Knol, J. e Oozeer, R. (2013). Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 27(1), 139–155.

Chang, J.Y., Antonopoulos, D.A., Kalra, A., Tonelli, A., Khalife, W.T., Schmidt, T.M. e Young, V.B. (2008). Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile* – associated diarrhea. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(3), 435–438.

Chow, J., Tang, H. e Mazmanian, S.K. (2011). Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), 473–480.

Clarke, G., O’Mahony, S.M., Dinan, T.G. e Cryan, J.F. (2014). Priming for health: gut microbiota acquired in early life regulates physiology, brain and behaviour. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 103(8), 812–819.

Clarke, G., Stilling, R.M., Kennedy, P.J., Stanton, C., Cryan, J.F. e Dinan, T. G. (2014). Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology*, 28(8), 1221–1238.

Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe H. e Farrow, J.A. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:812–826.

Consortium, T.H.M.P. (2013). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.

Costello, E.K. e Relman, D.A. (2014). Population health: Immaturity in the gut microbial community. *Nature*, 510(7505), 344–345.

Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y.K., Baban, S.T., Adamo, R., Kuehne, S.A., Scarselli, M., Minton, N.P., Serruto, D. e Unnikrishnan, M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 545–555.

Davis, L.M.G., Martínez, I., Walter, J., Goin, C. e Hutkins, R.W. (2011). Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PLoS ONE*, 6(9), 1– 10.

Delgado, G.T.C., Tamashiro, W.M.S.C. e Pastore, G.M. (2010). Immunomodulatory effects of fructans. *Food Research International*, 43(5), 1231–1236.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J. e Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325–2340.

Dewulf, E.M., Cani, P.D., Claus, S.P., Fuentes, S., Puylaert, P G., Neyrinck, A.M., Bindels, L.B., de Vos, W.M., Gibson, G.G., Thissen, J.P. e Delzenne, N.M. (2013). Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*, 62(8), 1112–1121.

Dicksved, J., Halfvarson, J., Rosenquist, M., Järnerot, G., Tysk, C., Apajalahti, J., Egstrand L. e Jansson, J. K. (2008). Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn’s disease. *The ISME Journal*, 2(7), 716–727.

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. e Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975.

Donlan, R.M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(8), 1387–1392.

- Dunne, W.M. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Society*, 15(2), 155–166.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. e Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308:1635–1638.
- Evans, J.M., Morris, L.S. e Marchesi, J.R. (2013). The gut microbiome: The role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *Journal of Endocrinology*, 218(3) R37-R47.
- Fasano, A. (2011). Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity and Cancer. *Physiological Reviews*, 91(1), 151–175.
- Fernandes, J., Su, W., Rahat-Rozenbloom, S., Wolever, T.M.S. e Comelli, E.M. (2014). Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. *Nutrition & Diabetes*, 4(6), e121.
- Finegold, S.M., Downes, J. e Summanen, P.H. (2012). Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*, 18:260–262.
- Finlay, B.B. e Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 136–69.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P. e Duncan, S.H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(10), 577–589.
- Fong, J.C.N., Syed, K.A., Klose, K.E. e Yildiz, F.H. (2010). Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology*, 156: 2757-2769.
- Forsythe, P., Sudo, N., Dinan, T., Taylor, V.H. e Bienenstock, J. (2010). Mood and gut feelings. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(1), 9–16.
- Francis, M.B., Allen, C.A. e Sorg, J.A. (2013). Muricholic acids inhibit *Clostridium difficile* spore germination and growth. *PLoS ONE*, 8(9).
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R., Boedeker, E.C., Harpaz, N. e Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104(34), 13780–13785.
- Fuller, R. e Gibson, G.R. (1998). Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clinical Microbiology and Infection*, 4(9), 477–480.
- García-Sánchez, J.E., García-Sánchez, E., Martín-Del-Rey, Á. e García-Merino, E. (2015). Las bacterias anaerobias 150 años después de su descubrimiento por Pasteur. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(2), 119-128.
- Gerding, D.N. (2004). Clindamycin, Cephalosporins, Fluoroquinolones, and *Clostridium difficile*-associated diarrhea: This is an antimicrobial resistance problem. *Clinical Infectious Diseases*, 38(5), 646–648.
- Gibson, G.R., Loo, J.V., Rastall, R.A. e Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics, *Nutrition Research Reviews*, 17, 259–275.
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M. e Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312, 1355–1359.
- Gonzalez, A., Stombaugh, J., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Gordon, J.I. e Knight, R. (2011). The mind-body-microbial continuum. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(1), 55–62.
- Gopal, P.K., Prasad, J. e Gill, H.S. (2003). Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. *Nutrition Research*, 23(10), 1313–1328.

- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J. e Gill, H.S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 207–216.
- Greathouse, K.L., Harris, C.C. e Bultman, S.J. (2015). Previews dysfunctional families: *Clostridium scindens* and secondary bile acids inhibit the growth of *Clostridium difficile*. *Cell Metabolism*, 21(1), 9–10.
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F. e Dinan, T.G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology*, 2, 1–15.
- Guarner, F. e Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512–519.
- Haghikia, A., Jörg, S., Duscha, A., Berg, J., Manzel, A., Waschbisch, A., Hammer, A., Lee, D.H., May, C., Wilck, N., Balogh, A., Ostermann, A., Schebb, N.H., Akkad, D.A., Grohme, D.A., Kleinewietfeld, M., Kempa, S., Thöne, J., Demir, S., Müller, D.N., Gold, R. e Linker, R.A. (2015). Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. *Immunity*, 43(4), 817–829.
- Conway, T. e Cohen, P.S. (2016). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *HHS Public Access*, 97(12), 5421–5433.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. e Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108.
- Hara, H., Li, S.-T., Sasaki, M., Tsukasa, M., Atsushi, T., Otaga, Y., Fujita, K., Ishigami, H., Fujimori, I. e Mitsuoka, T. (1994). Effective dose of lactosucrose on fecal flora and fecal metabolites of humans. *Bifidobacteria Microflora*, 13(2), 51–63.
- Hartemink, K.M. Van Laere e F. M. Rombouts. (1997). Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 367–374.
- Heimann, S.M., Vehreschild, J.J., Cornely, O.A., Wisplinghoff, H., Hallek, M., Goldbrunner, R., Bottiger, B.W., Goeser, T., Holscher, A., Baldus, S., Muller, F., Jazmati, N., Wingen, S., Franke, B. e Vehreschild, M.J.G.T. (2015). Economic burden of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a cost-of-illness study from a German tertiary care hospital. *Infection*, 43(6), 707–714.
- Hensgens, M.P.M., Goorhuis, A., Dekkers, O.M. e Kuijper, E.J. (2012). Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), 742–748.
- Hentges, D.J. (1992). Gut flora and disease resistance. In: *Probiotics: The Scientific Basis*. Fuller, R. (Ed.). (New York: Chapman & Hall), pp. 87–110.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. e Tashiro, Y. (1986). Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria and microflora*, 5(1), 37–50.
- Hillier, S.L., Krohn, M.A., Rabe, L.K., Klebanoff, S.J., Eschenbach, D.A. (2016). The Normal Vaginal flora, H₂O₂-producing *Lactobacilli*, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clinical Infectious Diseases*, 16(4).
- Hold, G.L., Pryde, S.E., Russell, V.J., Furrie, E. e Flint, H.J. (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 33–39.
- Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J., Schütte, U.M.E., Beck, D.L., Abdo, Z., Fox, L.K., Williamns, J.E., McGuire, M.K. e McGuire, M.A. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS ONE*, 6(6), 1–8.
- Isolauri, E. e Ouwehand, A.C. (2004). Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 299–313.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C. e Jansson, J.K. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 156(11), 3216–3223.

- Jousimies-Somer, H. e Summanen, P. (2002). Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding spirochetes). *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35(Suppl 1), 21.
- Kau, A.M., Ahernal, P.P., Griffin, N.W., Goodman, A.L. e Gordon, J.I. (2011). *Nature*, 474(7351), 327–336.
- Kelly, G. (2008). Inulin-Type Prebiotics – A Review : Part 1. *Alternative Medicine Review*, 13(4), 315-29.
- Khosravi, Y., Dieye, Y., Loke, M. F., Goh, K. L., e Vadivelu, J. (2014). *Streptococcus mitis* induces conversion of *helicobacter pylori* to coccoid cells during co-culture in vitro. *Plos one*, 9(11), 1–11.
- Kim, H.J., Camilleri, M. e Mckinzie, S. (2003). A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 17, 895–904.
- Kitahara, M., Takamine, F., Imamura, T. e Benno, Y. (2000). Assignment of *Eubacterium sp.* VPI 12708 and related strains with high bile acid dehydroxylating activity to *Clostridium scindens* and proposal of *Clostridium hylemonae* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 971–978.
- Klaenhammer, T.R. (2000). Symposium: Probiotic Bacteria: Implications for Human Health Probiotic Bacteria: Today and Tomorrow 1. *Journal of Nutrition*, 130, 415–416.
- Kleessen, B. e Blaut, M. (2005). Modulation of gut mucosal biofilms. *The British Journal of Nutrition*, 93, S35–S40.
- Kline, K.A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S. e Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host and Microbe*, 5(6), 580–592.
- Knoop, F.C., Owens, M. e Crocker, I.C. (1993). *Clostridium difficile*: Clinical disease and diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(3), 251–265.
- Kumar, M., Babaei, P., Ji, B. e Nielsen, J. (2016). Human gut microbiota and healthy aging: Recent developments and future prospective. *Nutrition and Healthy Aging*, 4(1), 3–16.
- Lawley, T.D., Clare, S., Walker, A.W., Stares, M.D., Connor, T.R., Raisen, C., Goulding, D., Rad, R., Schreiber, F., Brandt, C., Deakin, J.L., Pickard, J.D., Duncan, H.S., Flint, J.H., Clark, G.T., Parkhill, J. e Dougan, G. (2012). Targeted restoration of the intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice.
- Lawson, P.A., Citron, D.M., Tyrrell, K.L. e Finegold, S.M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95–99.
- Lindsay, J.O. (2006). Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn’s disease. *Gut*, 55(3), 348–355.
- Lobo, C., Moreno-ventas, C.L.X., Tapia-Paniagua, S., Rodríguez, C., Morin, M.A. e de La Banda, I.G. (2013). Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture.
- Lopetuso, L.R., Scalfaferrri, F., Petito, V. e Gasbarrini, A. (2013). Commensal clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogen*. 5:23.
- Lopetuso, L.R., Scalfaferrri, F., Franceschi, F. e Gasbarrini, A. (2014). The gastrointestinal microbiome - Functional interference between stomach and intestine. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 28(6), 995–1002.
- Lozupone, C., Stomabaugh, J., Gordon, J., Jansson, J. e Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230.

- Lupton, J.R. (2004). Diet induced changes in the colonic environment and colorectal cancer. *Journal of Nutrition*, 134, 479–482.
- Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays*, 33(8), 574–581.
- Macfarlane, G.T., Steed, H. e Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305–344.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. e Cummings, J.H. (2006). Review article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 24(5), 701–714.
- Madigan, T.M., Matinko, M.J., Dunlap, V.P. e Clark, P.D. (2010). Interações dos Microrganismos com o homem. In: *Microbiologia de Brock*, 12ª edição, pp. 812-838.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D. e Garcia-Gil, J.L. (2006). Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(12), 1136–1145.
- Mattila, E., Uusitalo-Seppälä, R., Wuorela, M., Lehtola, L., Nurmi, H., Ristikankare, M. e Arkkila, P. (2012). Fecal transplantation, through colonoscopy, is effective therapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology*, 142(3), 490–496.
- Mcfarland, L.V. (2000). Normal flora: Diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12, 193-207.
- Meydani, S.N. e Ha, W. (2000). Immunologic effects of yogurt. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1–4.
- Minton, N.P., Ehsaan, M., Humphreys, C.M., Little, G.T., Baker, J., Henstra, A.M., Liew, F., Kelly, L.M. e Sheng, L. (2016). A roadmap for gene system development in *Clostridium*. *Anaerobe*, 41, 104-112
- Moormeier, D.E. e Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 104(3), 365–376.
- Moretti, M. (2012). Breastfeeding and the use of antidepressants. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 19(3), 387-390.
- Morgan, X.C., Segata, N. e Huttenhower, C. (2013). Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends in Genetics*, 29(1), 51–58.
- Morris, G.N., Winter, J., Cato, E.P., Ritchie, A.E. e Bokkenheuser, V.D. (1985). *Clostridium scindens* sp. Nov., a human intestinal bacterium with desmolytic activity on corticoids. *International journal of systematic bacteriology*, 35(4), 478–481.
- Mountzouris, K.C., Kotzampassi, K., Tsirtsikos, P., Kapoutzis, K. e Fegeros, K. (2009). Effects of *Lactobacillus acidophilus* on gut microflora metabolic biomarkers in fed and fasted rats. *Clinical Nutrition*, 28(3), 318–324.
- Owens, Jr., R.C., Donskey, C.J., Gaynes, R.P., Loo, V.G. e Muto, C.A. (2008). Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46(s1), S19–S31.
- Pannaraj, P.S., Li, F., Cerini, C., Bender, J.M., Yang, S., Rollie, A. e Aldrovandi, G.M. (2017). Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatrics*, 90095, 1–8.
- Pantaléon, V., Soavelomandroso, A.P., Bouttier, S., Vedantam, G. e Candela, T. (2015). The *Clostridium difficile* protease Cwp84 modulates both biofilm formation and cell-surface properties. *PLoS ONE*, 10(4), 1–20.
- Parmar, A. (2016). Gut-brain axis, psychobiotics and mental health. *Asian Journal of Psychiatry*, 22, 84–85.
- Peshev, D. e Van den Ende, W. (2014). Fructans: Prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional*

Foods, 8(1), 348–357.

Pires, M.J. e Colaço, A. (2004). The role of bile acids in the pathology and therapy of hepatic diseases in dog and cat. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99(551), 137–143.

Power, S.E., O'Toole, P.W., Stanton, C., Ross, R.P. e Fitzgerald, G.F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*, 111(3), 387–402.

Proctor, L.M. (2016). The National Institutes of Health Human Microbiome Project. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 21(6), 368–372.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, S., Manichanh, C. e Yang, H. (2010). A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.

Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G. e Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition*, 101(4), 533.

Rani, K.S. e Srividya, N. (2016). Effect of inulin, fructooligosaccharides and *L. acidophilus* in formulating a synbiotic yoghurt. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 35(1), 37–40.

Rätsep, M., Kõljalg, S., Sepp, E., Smidt, I., Truusalu, K., Songisepp, E., Stsepetova, J., Naaber, P.R.H. e Mikelsaar, M. (2017). A combination of the probiotic and prebiotic product can prevent the germination of *Clostridium difficile* spores and infection. *Anaerobe*, 47, 94–103.

Reid, G., Younes, J.A., Mei, H.C. Van Der e Gloor, G.B. (2010). Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Publishing Group*, 9(1), 27–38.

Rendueles, O. e Ghigo, J.M. (2012). Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), 972–989.

Ridlon, J.M., Harris, S.C., Bhowmik, S., Kang, D.J. e Hylemon, P.B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes*, 7(1), 22–39.

Ridlon, J.M., Kang, D.-J. e Hylemon, P.B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 241–259.

Riegler, M., Sedivy, R., Pothoulakis, C., Hamilton, G., Zacherl, J., Bischof, G., Cosentini, E., Feil, W., Shiessel, R., LaMont, J.T. e Wenzl, E. (1995). *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2004–2011.

Rohde, H., Frankenberger, S., Zähringer, U. e Mack, D. (2010). Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology*, 89(1), 103–111.

Roller, M., Clune, Y., Collins, K., Rechkemmer, G. e Watzl, B. (2007). Consumption of prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* has minor effects on selected immune parameters in polypectomised and colon cancer patients. *The British Journal of Nutrition*, 97(4), 676–684.

Rupnik, M., Wilcox, M.H. e Gerding, D.N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Review Microbiology*, 7(7), 526–536.

Säemann, M.D., Böhmig, G.A., Osterreicher, C.H., Burtscher, H., Parolini, O., Diakos, C., Stöckl, J., Hörl, W.H. e Zlabinger, G.J. (2000). Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(15), 2380–2.

Sandstead, H.H. (1992). Fiber, phytates, and mineral nutrition. *Nutrition Reviews*, 50(1), 30–31.

- Santos, M.G.C. (2017). Avaliação da capacidade de adesão de diferentes ribotipos de *clostridioides difficile* à laminina-1. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 79f.
- Sarkar, A., Lehto, S.M., Harty, S., Dinan, T.G., Cryan, J.F. e Burnet, P.W.J. (2016). Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals. *Trends in Neurosciences*, 39(11), 763–781.
- Savignac, H.M., Corona, G., Mills, H., Chen, L., Spencer, J.P.E., Tzortzis, G. e Burnet, P.W.J. (2013). Neurochemistry International Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl- D - aspartate receptor subunits and D -serine. *Neurochemistry international*, 63(8), 756–764.
- Schmidt, K., Cowen, P.J., Harmer, C.J., Tzortzis, G., Errington, S. e Burnet, P.W.J. (2015). Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 232(10), 1793–1801.
- Scholz-Ahrens, K.E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Açil, Y., Glüer, C.C. e Schrezenmeir, J. (2007). Prebiotics, probiotics and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *The Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2), 838S–46S.
- Schultz, M., Timmer, A., Herfarth, H.H., Sartor, R.B., Vanderhoof, J.A. e Rath, H.C. (2004). *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterology*, 4, 3–6.
- Segain, J.P., Raingeard de la Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H.M. e Galmiche, J. P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47(3), 397–403.
- Semenyuk, E.G., Laning, M.L., Foley, J., Johnston, P.F., Knight, K.L., Gerding, D.N. e Driks, A. (2014). Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS ONE*, 9(1).
- Sender, R., Fuchs, S. e Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology*, 14(8), 1–14.
- Shanahan, F., Dinan, T.G., Ross, P. e Hill, C. (2012). Probiotics in transition. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(11), 1220–1224.
- Shoaf, K., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D. e Hutkins, R.W. (2006). Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 74(12), 6920–6928.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417–1435.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Grangette, G.C.C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H.M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P. e Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731–16736.
- Sorg, J.A. e Sonenshein, A.L. (2010). Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* spore germination using analogs of chenodeoxycholic acid, a bile acid. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 4983–4990.
- St. Amant, D.C., Valentin-Bon, I.E. e Jerse, A.E. (2002). Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. *Infection and Immunity*, 70(12), 7169–7171.
- Stabler, R.A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawlev, D.T., Sebahia, M., Quail, A.M., Rose, G., Gerding, N.D., Gibert, M., Popoff, R.M., Parkhill, J., Dougan, G. e Wren, B.W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biology*, 10(9), 1–15.
- Stefka, A.T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K. e Mazmanian, S.K. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *PNAS*, 111(36), 2–7.

- Studer, N., Desharnais, L., Beutler, M., Brugiroux, S., Kuehne, S.A., Minton, N.P., Stecher, B. e Bernier-latmani, R. (2016). Functional intestinal bile acid 7 α -dehydroxylation by *Clostridium scindens* associated with protection from *Clostridium difficile* infection in a gnotobiotic mouse model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(191), 1–15.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R. e Madigan Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 121). Elsevier Inc.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S.I. e Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(SUPPL.2), 251–262.
- Thelestam, M. e Chaves-Olarte, E. (2000). Cytotoxic effects of the *Clostridium difficile* toxins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 250, 85–96.
- Theriot, C.M., Koenigsnecht, M.J., Jr, P.E.C., Hatton, G.E., Nelson, A.M., Li, B. e Young, V.B. (2014). Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nature Communications*, 5:3114.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. e Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–131.
- Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I., Ley, R.E. e Ba, F. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS*, 102(31), 11070-5.
- Valdés-Varela, L., Hernández-Barranco, A.M., Ruas-Madiedo, P. e Gueimonde, M. (2016). Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* growth and toxicity when co-cultured in different prebiotic substrates. *Frontiers in Microbiology*, 7(738), 1–9.
- Vandenberg, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolics products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(3), 221-237.
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., Venema, K., Ramasamve, U., Schols, H.A. e De Vos, P. (2015). Immunological properties of inulin-type fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 414–436.
- Vogt, S.L. e Finlay, B.B. (2017). Gut microbiota-mediated protection against diarrheal infections. *Journal of Travel Medicine*, 24(suppl_1), S39–S43.
- Vollaard, E. e J. Clasener, H.A. (1994). Colonization resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 38, 409-414.
- Vos, A.P., van Esch, B.C., Stahl, B., M'Rabet, L., Folkerts, G., Nijkamp, F.P. e Garssen, J. (2007). Dietary supplementation with specific oligosaccharide mixtures decreases parameters of allergic asthma in mice. *International Immunopharmacology*, 7(12), 1582–1587.
- Walker, A.S., Eyre, D.W., Wyllie, D.H., Dingle, K.E., Harding, R.M., Connor, O. e Peto, T.E.A. (2012). Characterization of *Clostridium difficile* hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. *PLoS Medicine*, 9(2).
- Walton, G.E., Lu, C., Trogh, I., Arnaut, F. e Gibson, G.R. (2012). A randomised, double-blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan-oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers. *Nutrition Journal*, 11(1), 36.
- Wang, C., Nagata, S., Asahara, T., Yuki, N., Matsuda, K., Tsuji, H., Takahashi, T., Nomoto, K. e Yamashiro, Y. (2015). Intestinal microbiota profiles of healthy pre-school and school-age children and effects of probiotic supplementation. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 67(4), 257–266.
- Warren, Y.A., Tyrrell, K.L., Citron, D.M. e Goldstein, E.J.C. (2006). *Clostridium aldenense* sp. nov. and *Clostridium citroniae* sp. nov. isolated from human clinical infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7),

2416–2422.

Weingarden, A.R., Chen, C., Zhang, N., Graiziger, C.T., Dosa, P.I., Steer, C.S., Shaughnessy, M.K., Johnson, J.R. e Sadowsky, M.J. (2016). Ursodeoxycholic acid inhibits *Clostridium difficile* spore germination and vegetative growth, and prevents recurrence of ileal pouchitis associated with the infection. *HHS Public Access*, 65(1), 100–111.

Weirdo, P. (2009). On behalf of: Autism. *Chicago Journals*, 20(1), 2007–2010.

Wilson, K.H. (1983). Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *Journal of Clinical Microbiology*, 18(4), 1017–1019.

Wilson, K.H., Kennedy, M.J. e Fekety, F.R. (1982). Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(3), 443–446.

Wiström, J., Norrby, S.R., Myhre, E.B., Eriksson, S., Granström, G., Lagergren, L. e Svenungsson, B. (2001). Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(1), 43–50.

Yakob, L., Riley, T.V, Paterson, D.L., Marquess, J., Magalhaes, R.J.S., Furuya-kanamori, L. e Clements, A.C.A. (2015). Mechanisms of hypervirulent *Clostridium difficile* ribotype 027 displacement of endemic strains: an epidemiological model. *Nature Publishing Group*, 1–9.

Yamano, T., Iino, H., Takada, M., Blum, S., Rochat, F. e Fukushima, Y. (2006). Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. *The British Journal of Nutrition*, 95(2), 303–12.

Yip, C., Loeb, M., Salama, S., Moss, L. e Olde, J. (2014). Quinolone use as a risk factor for nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22(9), 572–575.

Yu, Z.T., Chen, C., Kling, D.E., Liu, B., McCoy, J.M., Merighi, M., Heiditman, M. e Newburg, D.S. (2013). The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology*, 23(2), 169–177.

Yutin, N. e Galperin, M.Y. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2631–2641.