



DEPARTAMENTO DE
MICroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MICROBIOMA HUMANO

IMPLICAÇÕES NA SAÚDE E NA DOENÇA

Robson Francisco de Souza

Laboratório de Estrutura e Evolução de Proteínas
robfsouza@gmail.com

Diversidade de procariotos

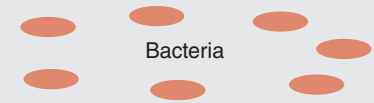
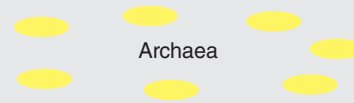
- Taxonomia de Procariotos

Taxonomia é a ciência que descreve e classifica os organismos e busca entender as relações de parentesco entre os diferentes grupos de organismos

- **Quais são os principais grupos de bactérias?**
- **Microbiota humana**

Taxonomia

Domínio



Reino



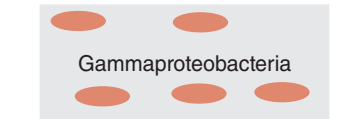
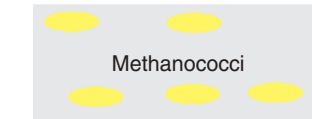
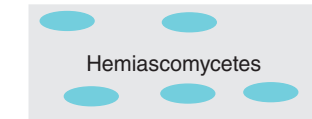
Não é usado

Não é usado

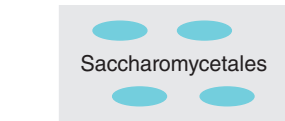
Filo



Classe



Ordem



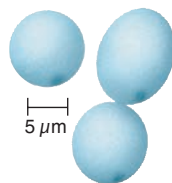
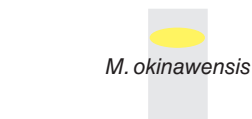
Familia



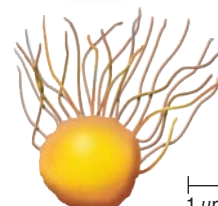
Gênero



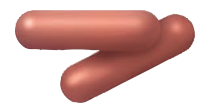
Espécie



Baker's yeast

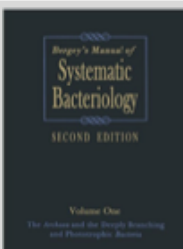


Methanococcus

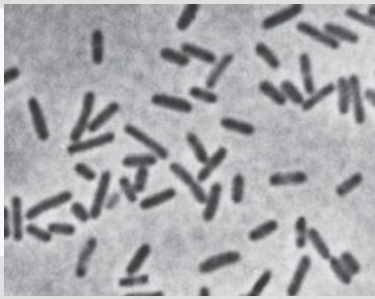


0.5 μm

E. coli

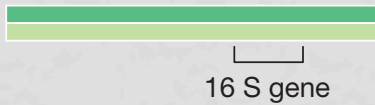


Métodos genotípicos filogenia do rRNA 16S



Norbert Pfenning

Isolate DNA



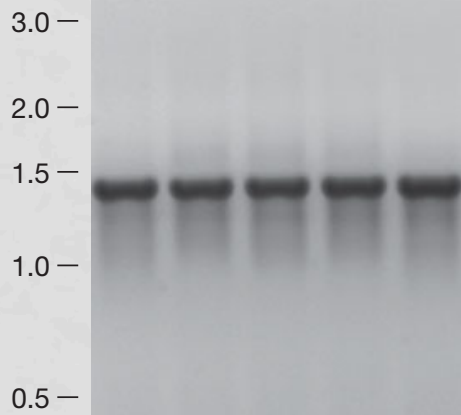
Amplify 16S
gene by PCR



Run on agarose
gel; check for
correct size

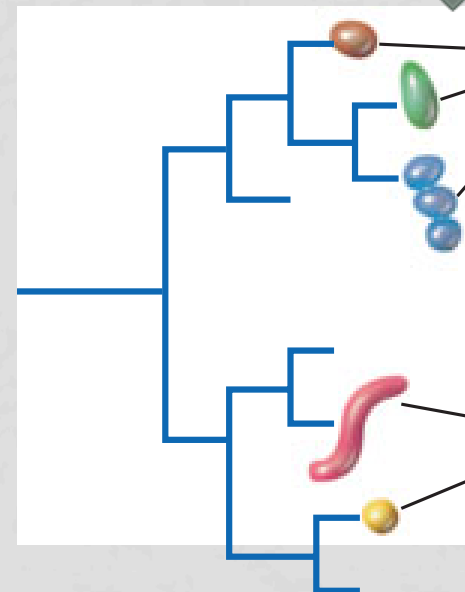
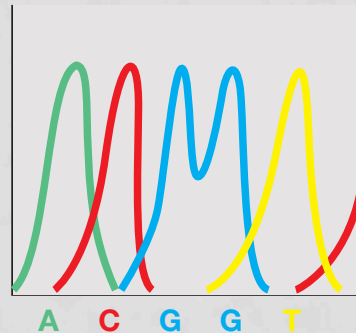
Kilo-
bases

1 2 3 4 5



Jennifer Ast and Paul Dunlap

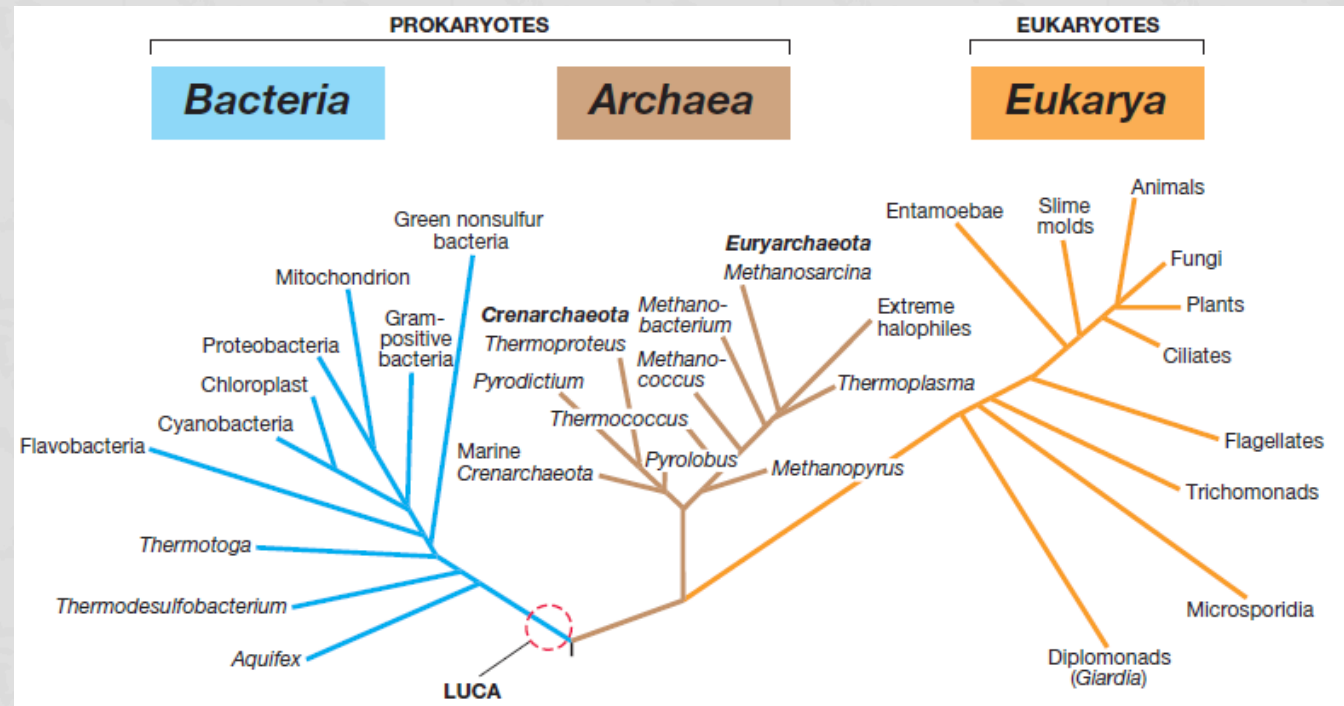
| | |
|------------------|---------------------------------|
| Espécie 1 | TACGCAGCCAGATACATGCCAAGATATTTCG |
| Espécie 2 | TTCGCAACCTGATACATCCTAAGATATTTCG |
| Espécie 3 | TTCGCAGCCAGGTACATCCCAAGATATTTCG |
| Espécie 4 | TTCGCAACCAGGTACATCCTAAGATATCCG |



Espécie 1
Espécie 2
Espécie 3

Espécie 4
Espécie 5
Espécie 6
Espécie 7

Carl Woese: os três domínios da vida



- Revolução na classificação da vida
- Transição da classificação baseada em fenótipo para uma baseada em genótipo
- Separação entre Bactérias e Arqueas

Woese, C. R.; G. E. Fox (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (11): 5088–5090.

Bactérias

Grupos principais de bactérias

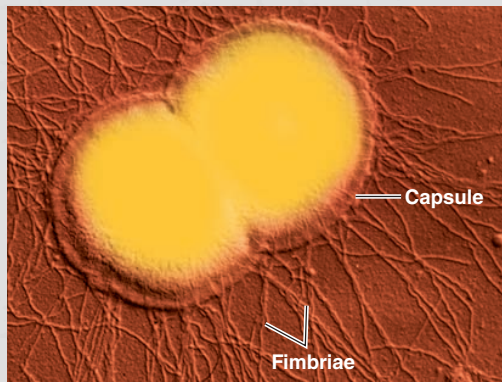
Classificação baseado principalmente na sequência do rRNA

- Proteobactérias
- Cianobactérias
- Espiroquetas
- Clamídias

Proteobactéria

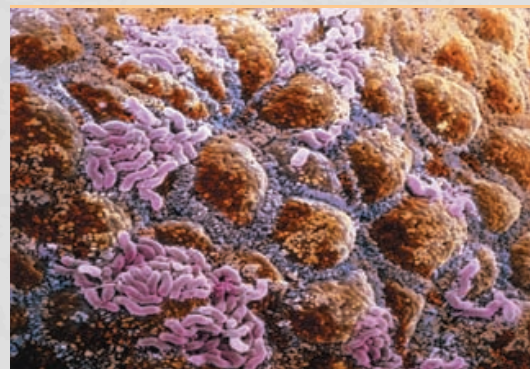
Bactérias

- Inclui maioria das bactérias Gram-negativas
- Maior grupo em termos de diversidade de espécies
- Mitochondrias de eucariotos derivadas de proteobactérias por endossimbiose



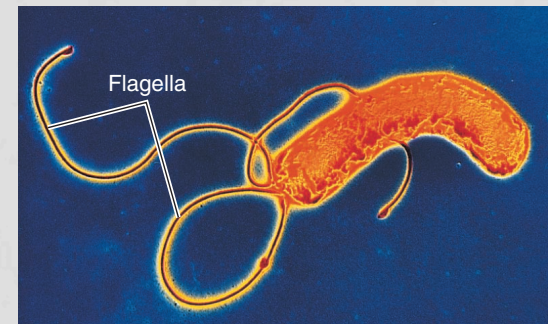
Neisseria gonorrhea
causa gonorrhea

| | |
|---------|---------------------------|
| Domínio | Bacteria |
| Filo | Proteobacteria |
| Classe | Betaproteobacteria |
| Ordem | Neisseriales |
| Família | Neisseriaceae |
| Gênero | <i>Neisseria</i> |
| Espécie | <i>N. gonorrhea</i> |



Escherichia coli
comensal, gastroenterite

| | |
|---------|----------------------------|
| Domínio | Bacteria |
| Filo | Proteobacteria |
| Classe | Gammaproteobacteria |
| Ordem | Enterobacteriales |
| Família | Enterobacteriaceae |
| Gênero | <i>Escherichia</i> |
| Espécie | <i>E. coli</i> |

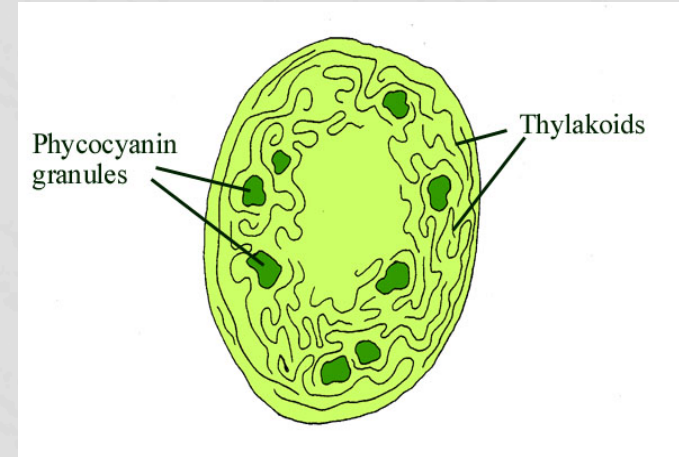
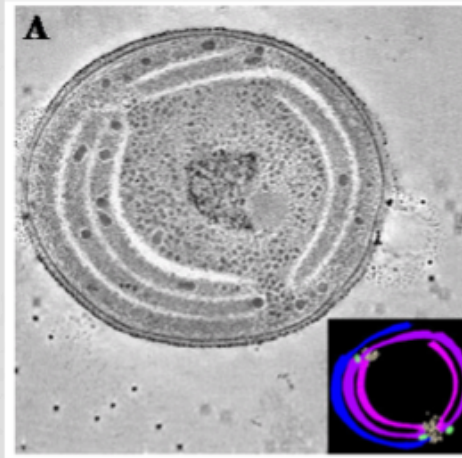


Helicobacter pylori
úlceras, cancer estomacal

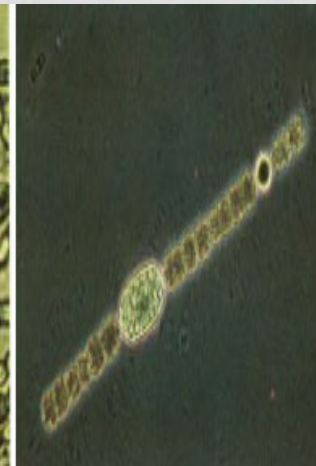
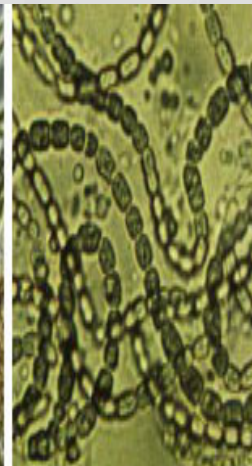
| | |
|---------|------------------------------|
| Domínio | Bacteria |
| Filo | Proteobacteria |
| Classe | Epsilonproteobacteria |
| Ordem | Campylobacterales |
| Família | Helicobacteraceae |
| Gênero | <i>Helicobacter</i> |
| Espécie | <i>H. pylori</i> |

Cianobactérias

- Grande importância ecológica: ciclos de carbono, oxigênio e nitrogênio
- Modo de vida livre ou comensal (plantas)
- Células isoladas ou colônias
- Utilizam clorofila-A para fotossíntese e liberam gás oxigênio
- Deram origem aos cloroplastos por endossimbiose
- Possuem sistema de membrana interna (tilacóides) semelhante ao dos cloroplastos



Cloroplasto



Anabaena

Espécie fixadora de nitrogênio

Synechococcus

Espécie de ambientes marinhos e águas termais

Bactérias

Espiroquetas

- Morfologia e modos de locomoção únicos
- Possuem forma de um longo cilindro em espiral, parecidas com saca-rolhas
- Possuem um filamento axial e endoflagelo no espaço periplásmico
- Muitas são parasitas de seres humanos. Outros vivem em lamas ou água



Endoflagelo
corte transversal



Borrelia burgdorferi
causador da doença de Lyme

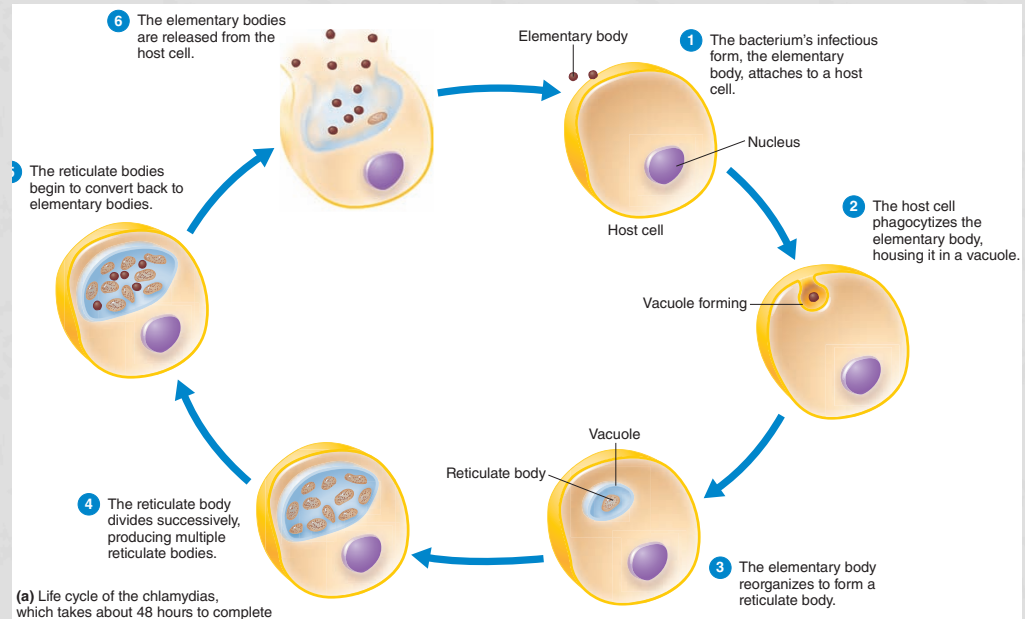
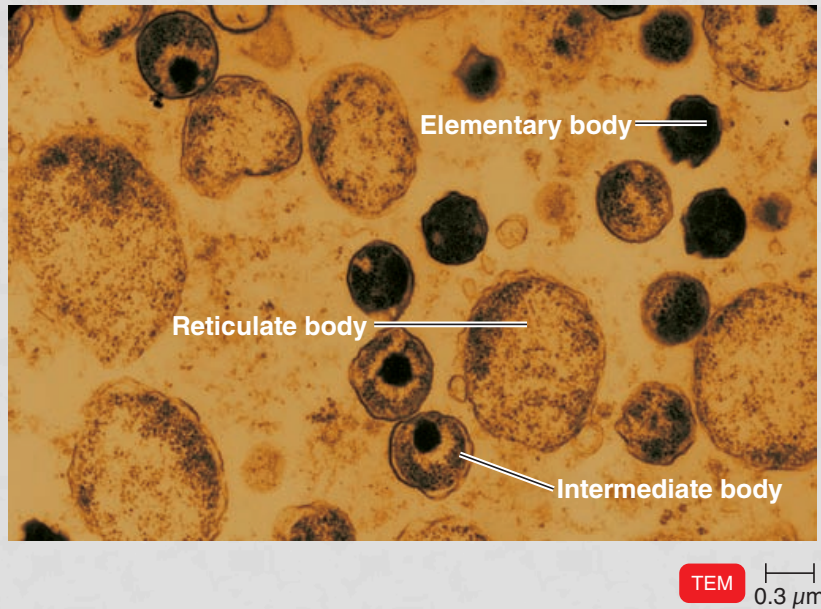


Treponema pallidum
causador da sífilis

Bactérias

Clamídias

- Menores bactérias (0,2 a 1,5 μm de diâmetro)
- Parasitas intracelulares obrigatórios
- Obtém ATP da célula hospedeira



Exemplo: *Chlamydia trachomatis*

Maior causa de cegueira no mundo

Também causa uretrite (doença sexualmente transmitida)

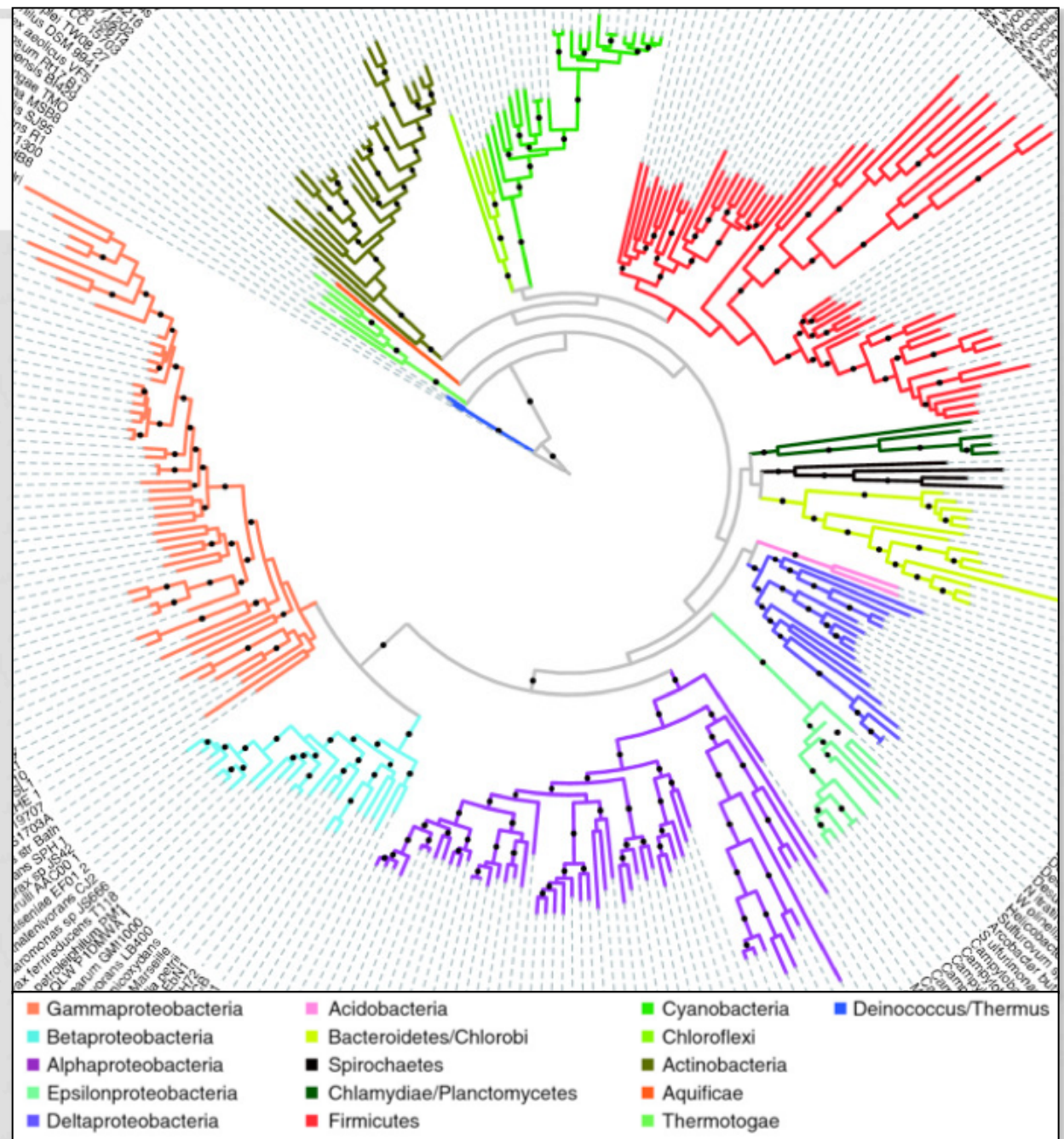
Filogenia das Bacterias

À direita: árvore de máxima verossimilhança construída a partir do alinhamento concatenado de 31 proteínas codificadas por genes *housekeeping*

<http://www.bacterio.net/-classifphyla.html>

<http://itol.embl.de>

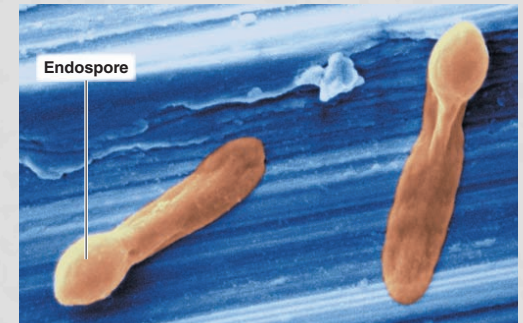
<http://tolweb.org/tree/>



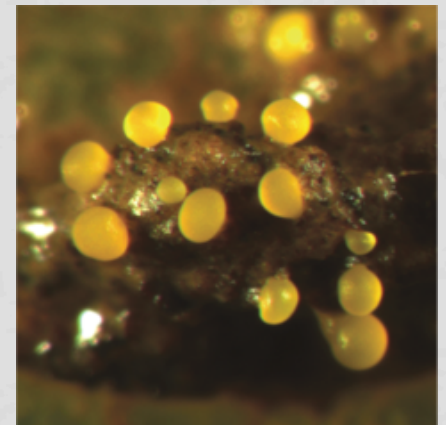
Perguntas

- 1) A que classe e filo pertencem as bactérias com as características abaixo? Nota: cada item descreve um grupo diferente.
 - 1) São anaeróbicas, Gram+ e formam endósporos. Causam as doenças tétano e enterocolite necrosante;
 - 2) Bacilos gram-negativos encontrados no solo, formam corpos de frutificação e possuem os maiores genomas conhecidos de bactérias.

- 2) Durante anos os pesquisadores não conseguiam entender porque encontravam DNA semelhante ao de cianobactérias em amostras de bactérias do intestino humano. No final, revelou-se que era um novo grupo de bactérias, “Melainabacteria”, uma linhagem irmã das cianobactérias. Porque o espanto dos pesquisadores com a possibilidade de cianobactérias viverem no interior do corpo humano?



C. difficile

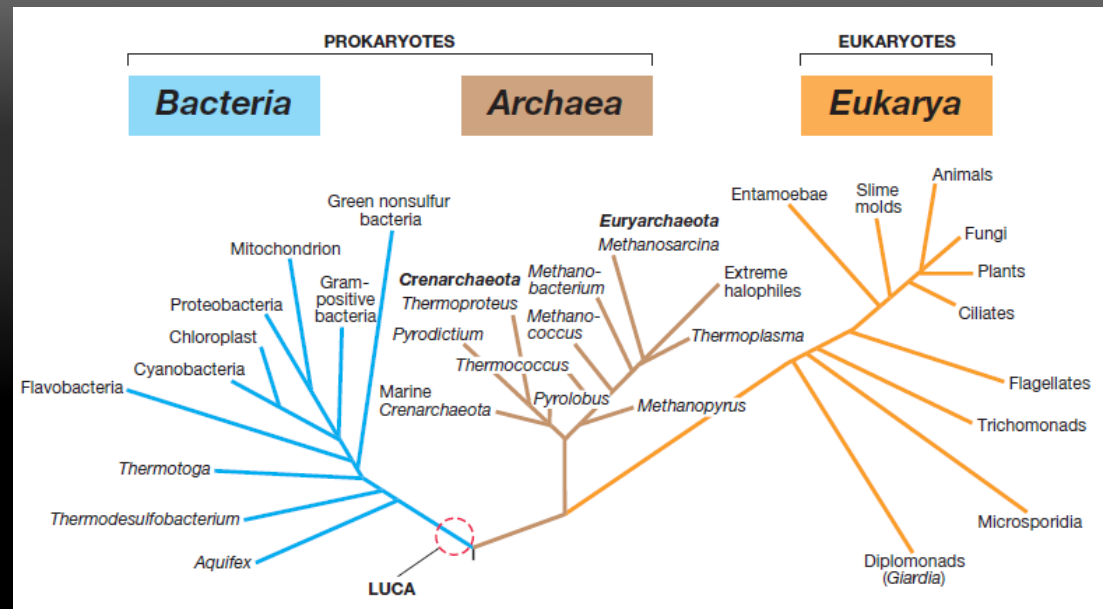


Corpos de frutificação

Microbiota

tópicos

- Definição;
- Tipos;
- Distribuição;
- Formação;
- Função;
- Na Doença;
- Tratamento;



Microbiota

Definição

População de microrganismos que habita a pele e as membranas mucosas de um indivíduo saudável

O Termo **flora** refere às plantas, enquanto que os microrganismos pertencem aos grupos protista e das bactérias. Isto deve-se a estes organismos terem sido classificados entre as plantas na taxonomia de Lineu.

Sinónimos

Microbiota indígena
Microbiota autóctone
Microbiota residente

Disbiose

Desequilíbrio na microbiota associado a doenças

Microbiota

Tipos

- **MICROBIOTA INDÍGENA**
 - Sinônimos: RESIDENTE ou AUTÓCTONE
 - Composição
 - Bactérias indígenas: > 1% da microbiota total
 - Bactérias suplementares: <1% da microbiota total
- **MICROBIOTA TRANSITÓRIA**
 - Sinônimos: ALÓCTONE ou EXÓGENA

Microbiota transitória

- Microrganismos que podem habitar a pele e/ou membranas mucosas por horas, dias ou semanas mas que **não se restabelecerão autonomamente**
- **Oportunistas:** patógenos normalmente inócuos podem ganhar uma vantagem competitiva quando a população de competidores é diminuída. Exemplo: *Clostridium difficile*
- Exemplos
 - Deslocamento do sítio normal no corpo humano (e.g. *Staphylococcus epidermidis* em cateter);
 - Imunocomprometidos – microbiota pode multiplicar em excesso e causar infecções.

Mais algumas definições...

| Simbionte | | |
|--|---|-----------------------------------|
| Organismo que vive em associação com organismo(s) de outra espécie | | |
| Ectossimbionte (sobre) | | Endossimbionte (dentro) |
| Parasita | Comensal | Mutualista |
| Causa dano ao hospedeiro | Vive em associação sem causar dano ou benefício | Ambos os organismos se beneficiam |
| biotrófico | | |
| necrotrófico | | |

- Transições entre os modos de vida acima são possíveis e frequentes!!!!
- Mecanismo: aquisição de fatores de virulência e/ou Ilhas de patogenicidade por transferência lateral de genes

Microbiota: potencialmente patogênicas



| BACTERIUM | Lower Intestine |
|---|-----------------|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> * | ++ |
| <i>Streptococcus mitis</i> | +/- |
| <i>Enterococcus faecalis</i> * | ++ |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> * | +/- |
| <i>Veillonellae sp.</i> | +/- |
| <i>Enterobacteriaceae</i> * (<i>Escherichia coli</i>) | ++ |
| <i>Proteus sp.</i> | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> * | + |
| <i>Bacteroides sp.</i> * | ++ |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | ++ |
| <i>Lactobacillus sp.</i> | ++ |
| <i>Clostridium sp.</i> * | ++ |
| <i>Clostridium tetani</i> | +/- |
| <i>Corynebacteria</i> | + |
| <i>Mycobacteria</i> | + |
| <i>Spirochetes</i> | ++ |
| <i>Mycoplasmas</i> | + |

++ = nearly 100 percent + = common +/- = rare * = potential pathog

Sucessão Microbiana Intestinal

Pós-parto

Colonizadores secundários:
Bacteroides, Clostridia,
Bifidobacterium

A partir dos 6 meses

Microbiota – mais diversa e complexa



Nascimento

Colonizadores primários:
E. coli e *Enterococcus*

Até 6 meses

Microbiota sofre interferência do tipo alimentação

Adulto

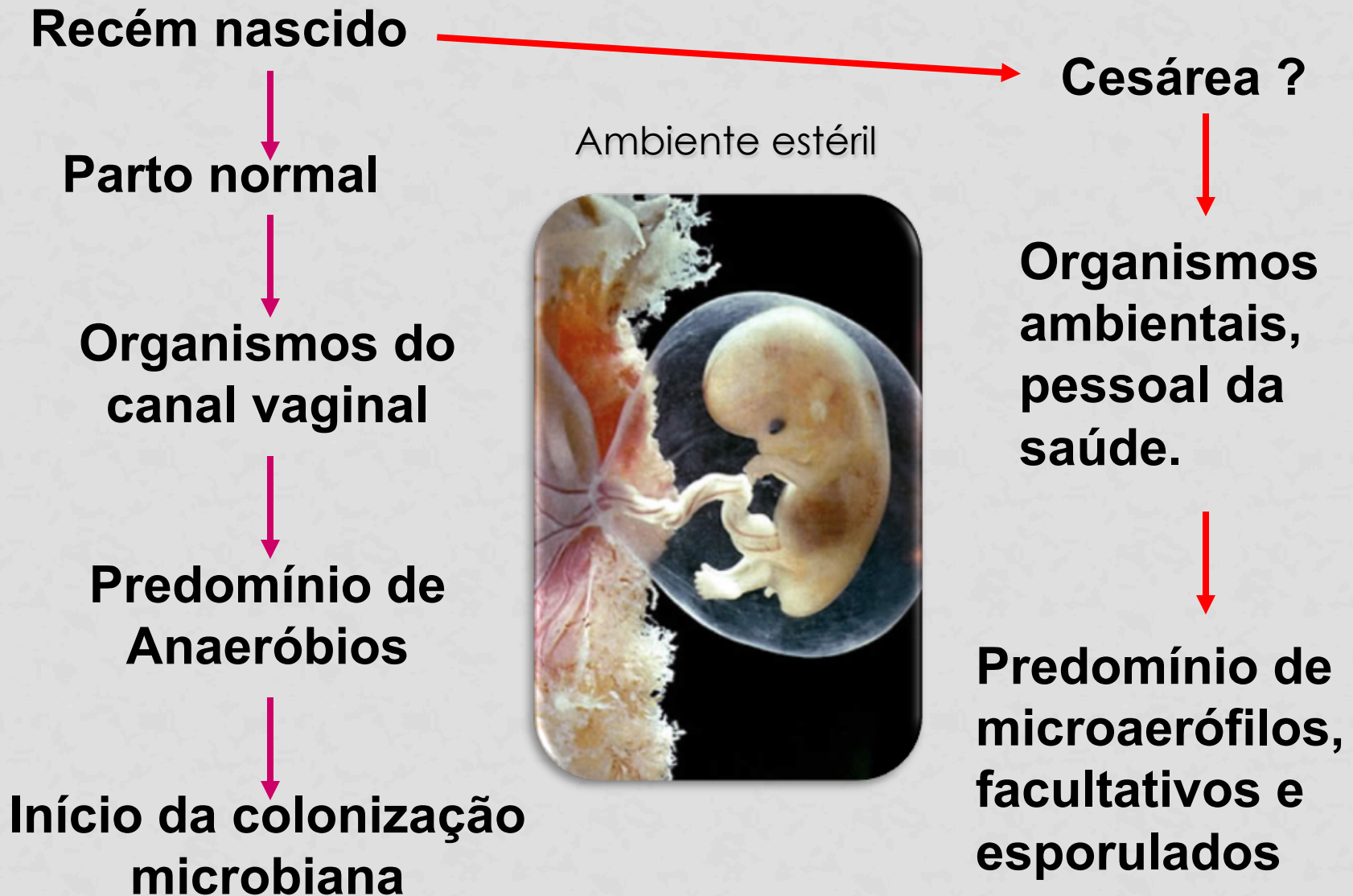
Redução gradual da diversidade – Bacteroidetes e Firmicutes e estabilidade

DETERMINANTES NA COLONIZAÇÃO MICROBIANA ÀS SUPERFÍCIES CELULARES

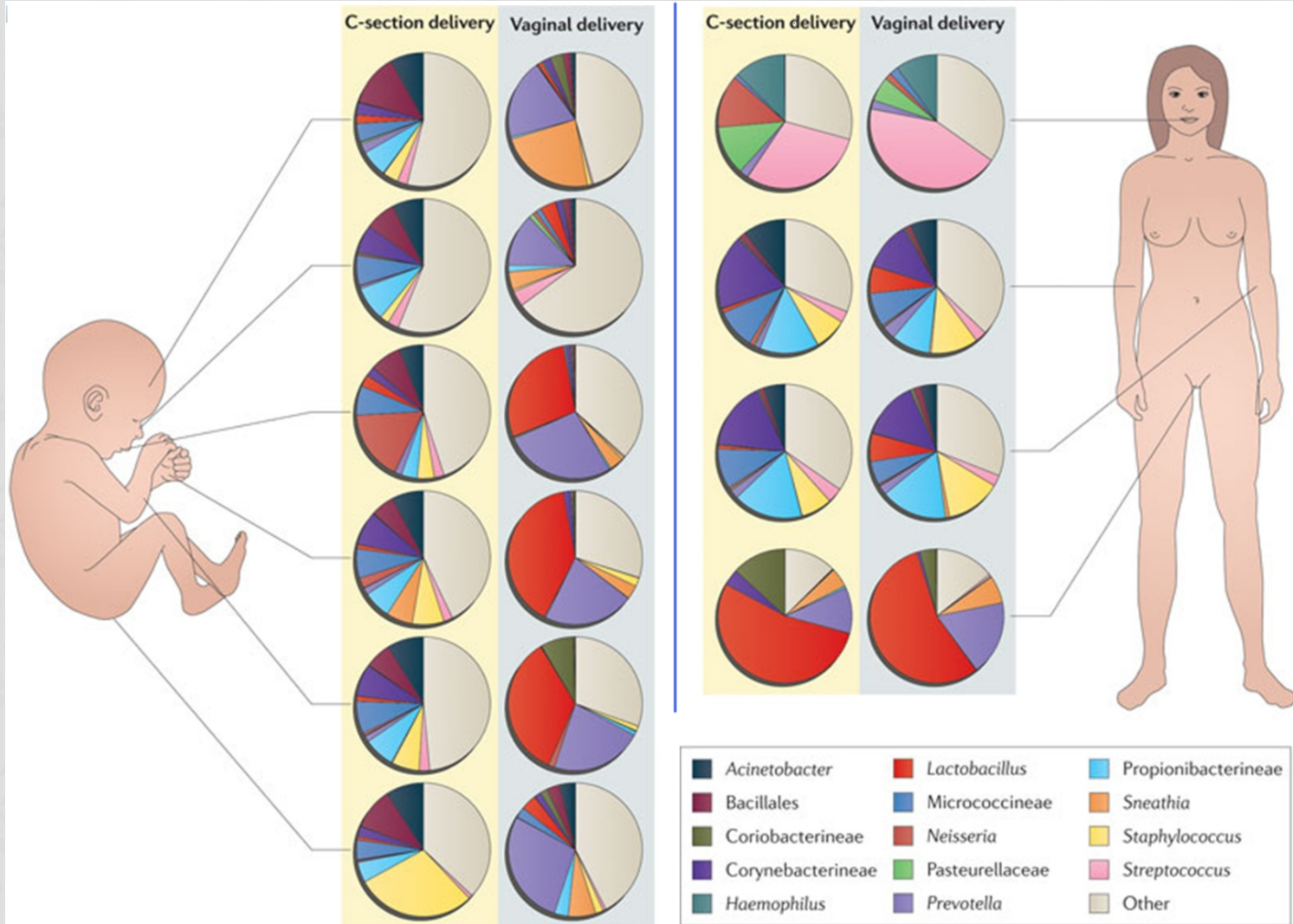
- **Disponibilidade de nutrientes: qualidade e quantidade**
- **Disponibilidade do oxigênio**
- **Fluxo de fluídos da superfície epitelial**
- **Sistema de limpeza muco-ciliar**
- **Sistema imune local**
- **Receptores análogos**
- **Interação microbiana: competição e cooperação**
- **Variação do pH**

Adquisição da Microbiota

Influência do tipo de nascimento

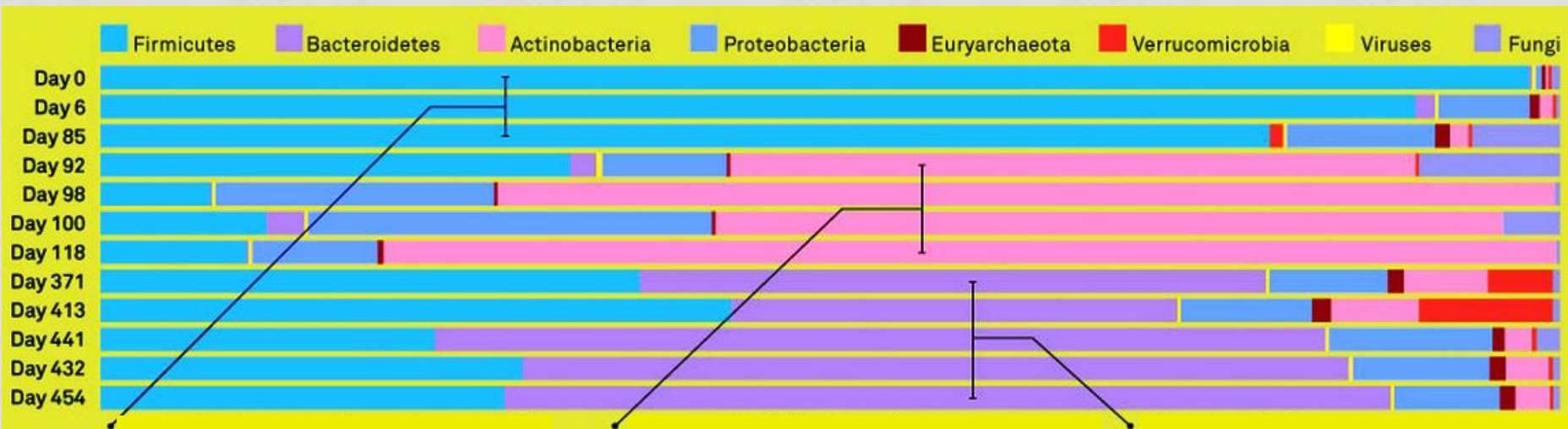


Cesária Vs Natural



Alterações na microbiota intestinal

Primeiro ano de vida



Firmicutes dominam o intestino do recém-nascido: *Lactobacillus* do leite

Actinobacterias se tornam comuns, talvez por causa de uma febre por volta do 92º dia

O bebê começa a ingerir frutas e cereal de arroz e **Bacteroidetes** adaptados à digestão de material vegetal passam a dominar

ESTABELECIMENTO DA MICROBIOTA INDÍGENA

Recém nascido

Cavidade bucal

Trato intestinal

Trato vaginal

24 h

Aeróbios

Facultativos

Anaeróbios

6 meses

2 h

Bactérias maternas/ambiente

E. coli/estreptococos
(10^8 - 10^{11} céls/g fezes)

7-15 dias

Colonização-anaeróbios:
Bifidobacterium, Clostridium,
Bacteroides

24 h

Aeróbios: difteróides

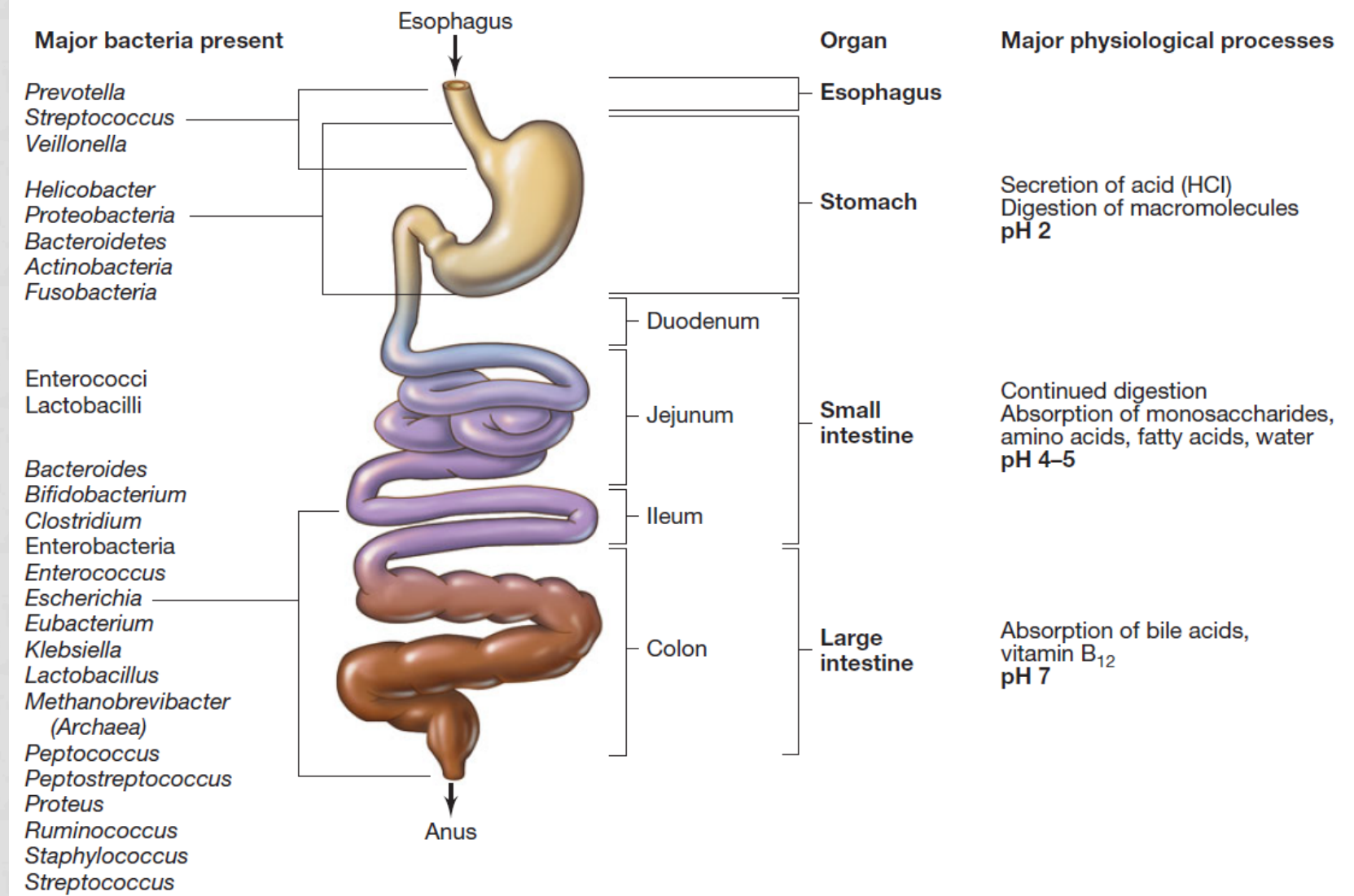
- Estrógeno materno
- Glicogênio

Lactobacillus, pH

15-30 dias

Microbiota~adulto

Distribuição no TGI



Microbiota Anaeróbia Fecal do Homem e Animais

1. ***Bacteroides*** (10^{11} /g peso seco fezes)

2. ***Eubacterium*** (10^{10} /g p.s.f.)

3. ***Peptococcaceae*** (10^9 - 10^{10} /g p.s.f.)

Ruminococcus, Coprococcus, Peptostreptococcus

4. ***Bifidobacterium*** (10^9 /g p.s.f.)

5. ***Clostridium*** (10^8 - 10^9 /g p.s.f.)

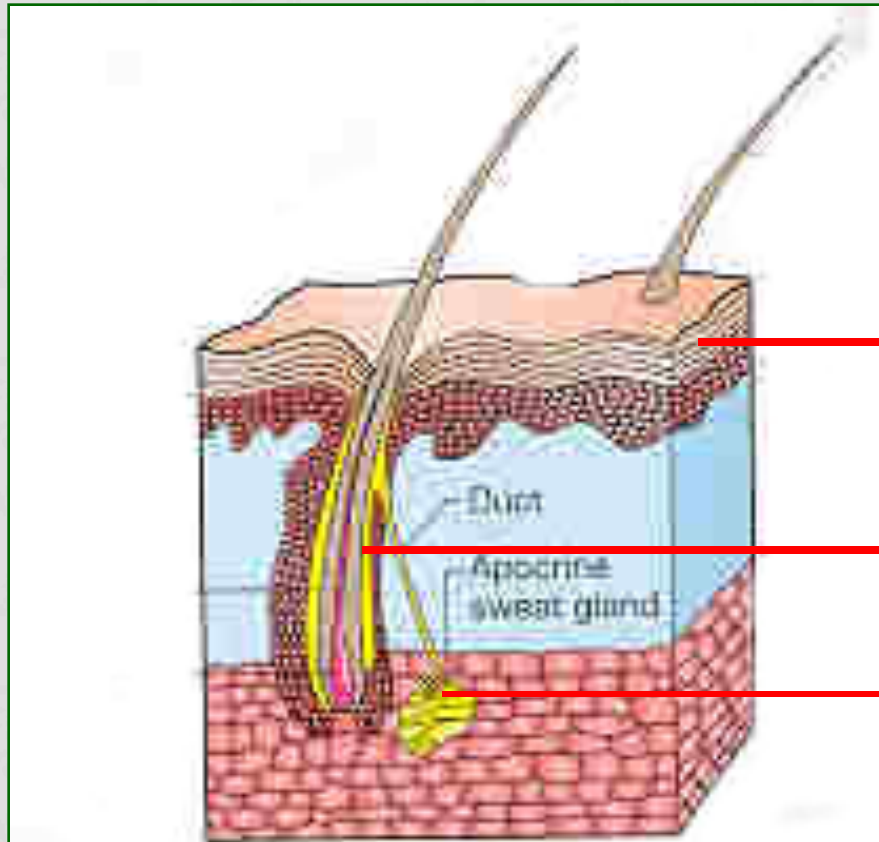
6. **Outros**

Lactobacillus, Megasphaera, Veillonella, Butyrivibrio, Succinovibrio, Succinomonas, Selenomonas, Anaerovibrio, Lachnospira e Treponema

7. **Facultativos** ($< 10^8$ /g p.s.f.)

Coliformes, estreptococos e lactobacilos

Microbiota da pele



Estrato córneo

Folículo piloso

Glândula sebácea

$10^4 - 10^6$ bactérias/cm²

S. epidermidis

S. aureus

Corynebacterium spp.

Streptococcus spp.

Propionibacterium spp.

Microbiota - Função

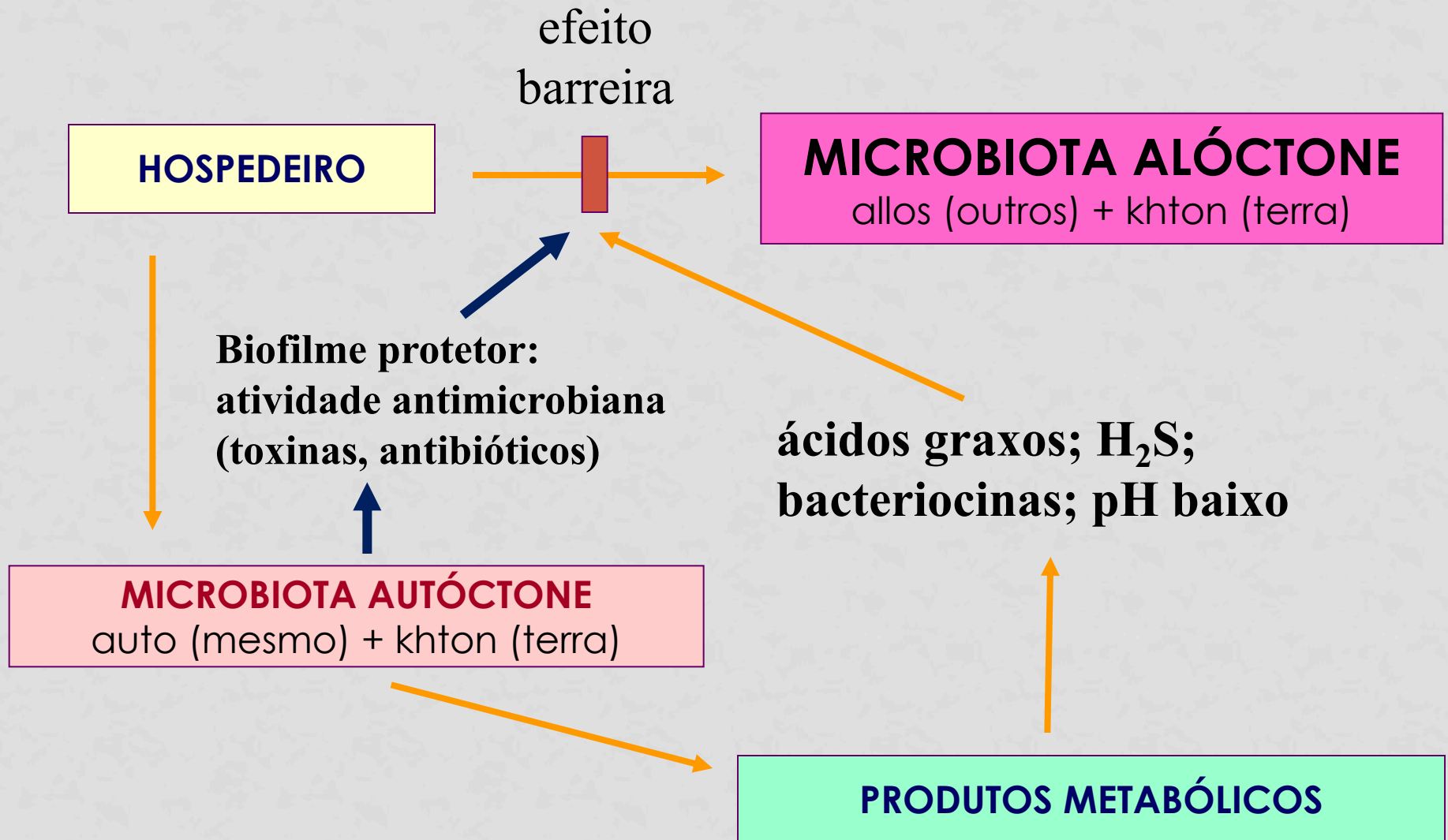
- Biofilme protetor:
 - Competição com bactérias patogênicas por sítios de adesão e microambientes (antagonismo microbiano);
- Ativamente envolvida na regulação imune e na homeostase;
- Exerce funções-chave no metabolismo do hospedeiro, auxiliando na digestão e absorção de alimentos;

Exemplo

O número e o tipo de bactérias na vagina tem um profundo efeito sobre a saúde das mulheres e seu risco de contrair ou transmitir doenças sexualmente transmissíveis.

Alterações no pH 3,5-4,5, permite o crescimento de fungos e outras bactérias.

MICROBIOTA RESIDENTE: REGULAGEM

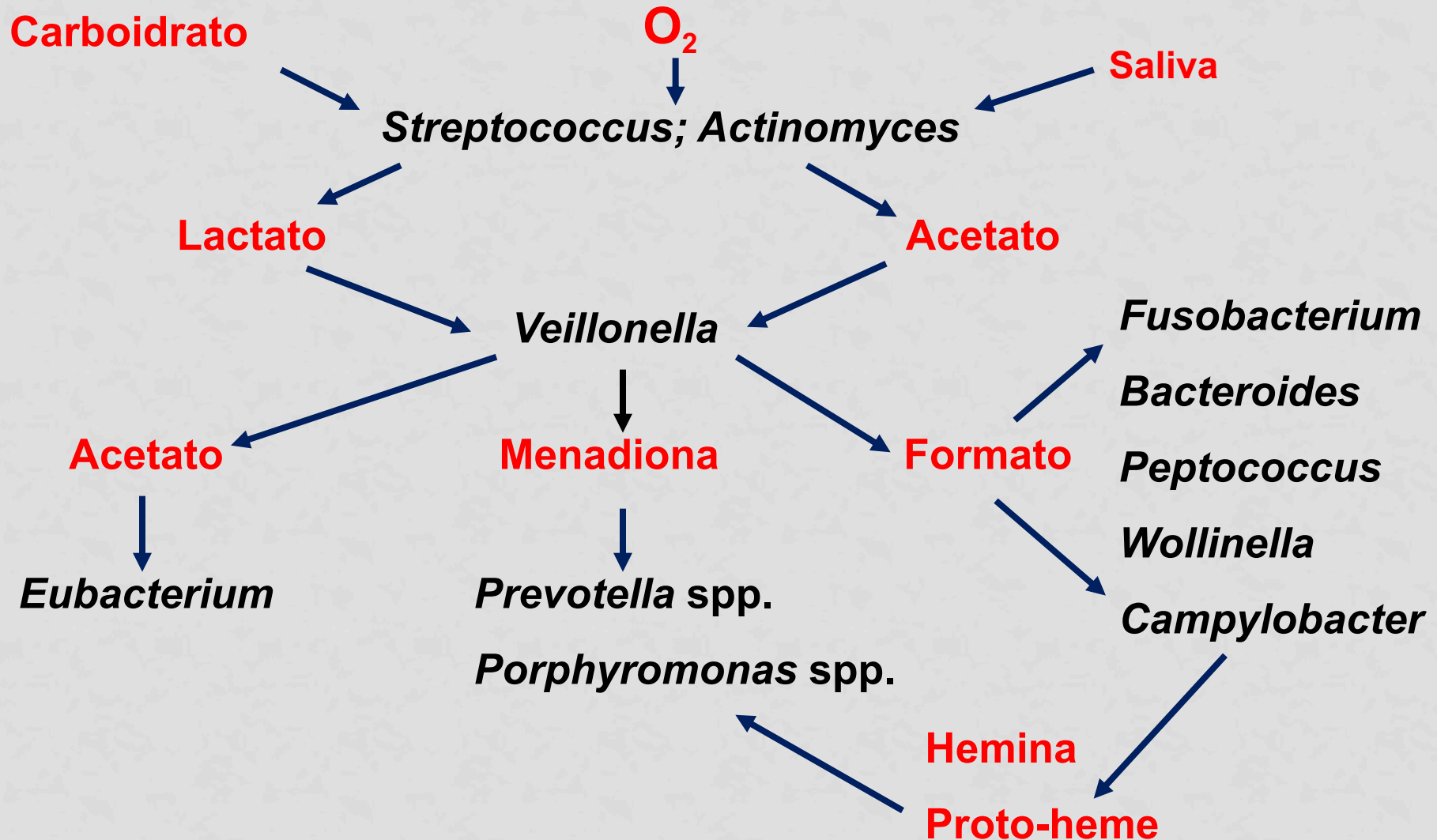


Contribuições metabólicas de micro-organismos intestinais

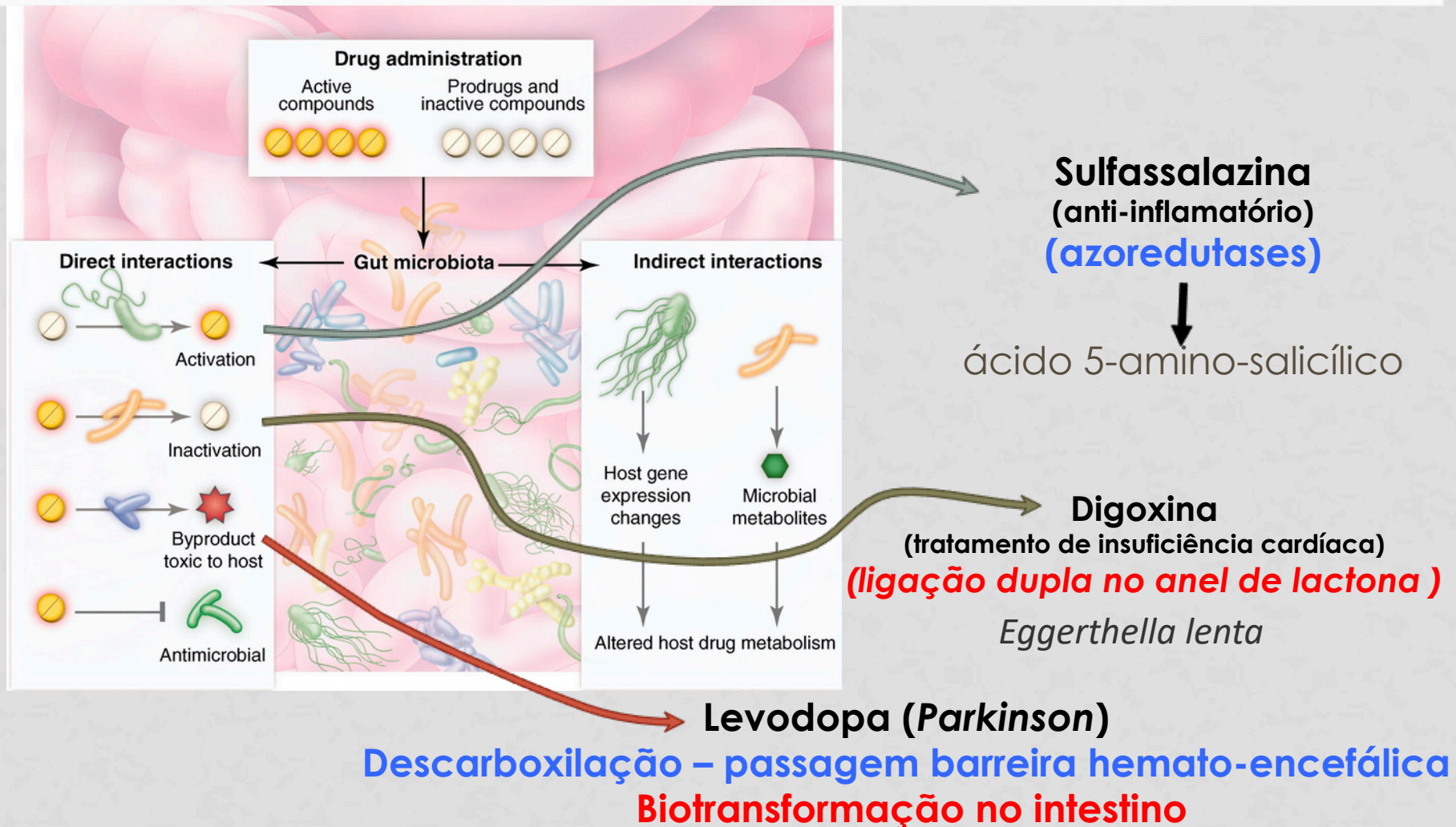
| <i>Process</i> | <i>Product</i> |
|---------------------------------|---|
| Vitamin synthesis | Thiamine, riboflavin, pyridoxine, B ₁₂ , K |
| Gas production | CO ₂ , CH ₄ , H ₂ |
| Odor production | H ₂ S, NH ₃ , amines, indole, skatole, butyric acid |
| Organic acid production | Acetic, propionic, butyric acids |
| Glycosidase reactions | β-Glucuronidase, β-galactosidase, β-glucosidase, α-glucosidase, α-galactosidase |
| Steroid metabolism (bile acids) | Esterified, dehydroxylated, oxidized, or reduced steroids |

Microbiota humana

Interações nutricionais



Interações da microbiota na terapia medicamentosa



Is It Time for a Metagenomic Basis of Therapeutics?

Therapeutic Modulation of Microbiota-Host Metabolic Interactions.

Disbioses

Desequilíbrio na microbiota associado a doenças
Fatores que influenciam a aquisição ou equilíbrio da microbiota

Independente do comportamento do hospedeiro

Condições ambientais

Imunidade

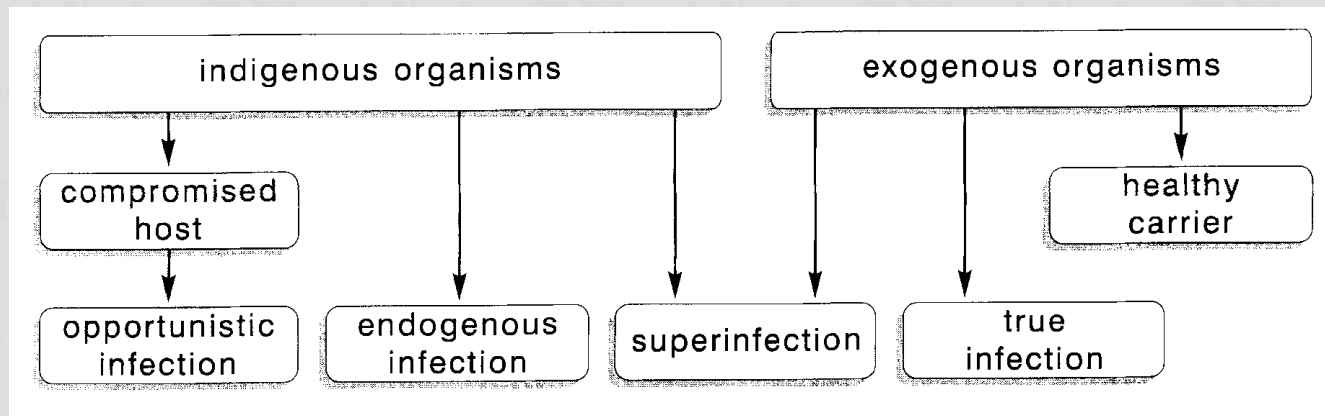
Presença de patógenos

Fatores comportamentais

Higiene

Dieta

Uso de Antimicrobianos



Aparelho Respiratório:
Infecções do aparelho respiratório superior, pneumonia necrotizante, abscesso pulmonar, pneumonia aguda.

Abdômen: abscessos intra-abdominais, abscesso hepático, peritonite.

Pele e Tecidos Moles:
feridas profundas infectadas, abscessos profundos, septicemia, gangrena, celulite.



Sistema Nervoso Central e Cabeça: Infecções periodontais, otite média crônica, abscesso cerebral, sinusite crônica.

Boca: cárie e periodontite.

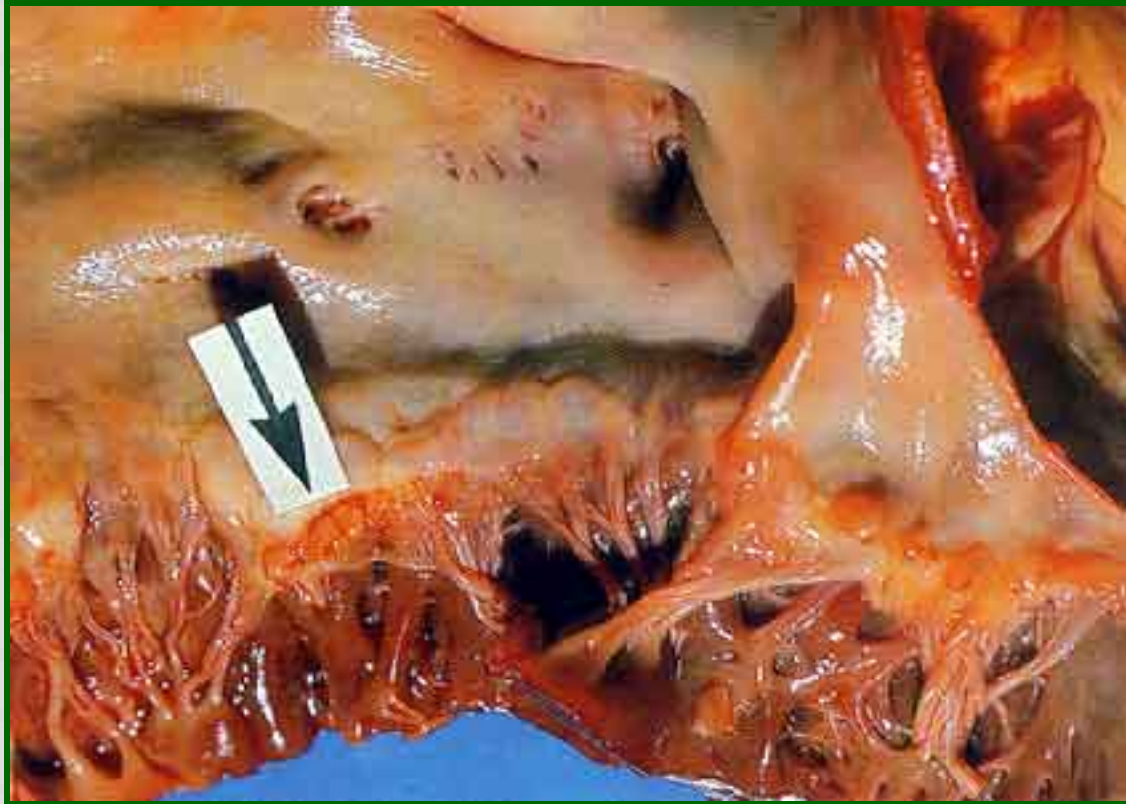
Tórax: endocardite, bacteremia, abscessos.

Trato Genital Feminino:
abscesso tubo-ovariano, abscesso pélvico, aborto séptico, endometrite

Participação de microrganismos em processos infecciosos

Participação microbiana em processos infecciosos

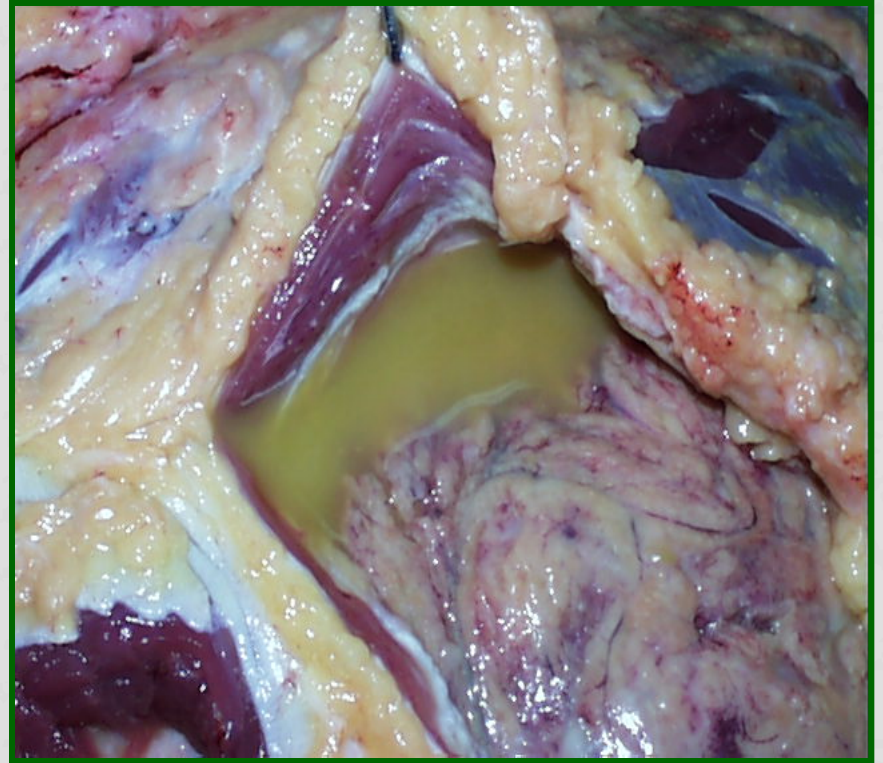
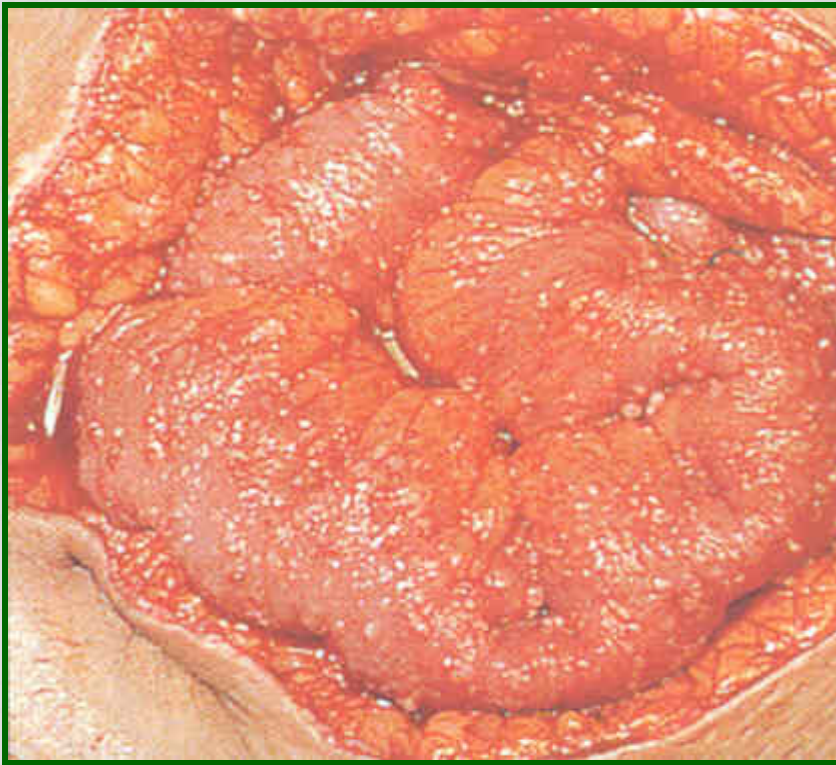
Peptococcus spp. e *Peptostreptococcus* spp.



Endocardite

Participação bacteriana em processos infecciosos

Bacteroides fragilis

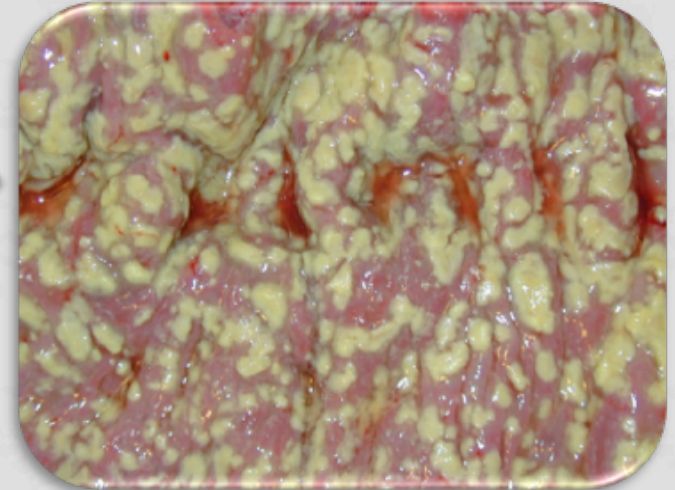


Peritonite

Microbiota intestinal

novos vínculos com doenças e disbioses **emergentes**

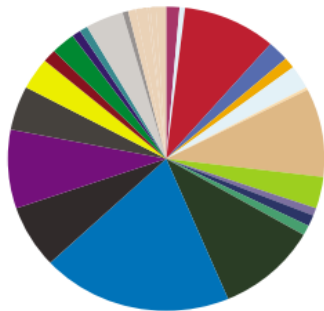
- Colite pseudomembranosa
- Colite ulcerativa →
- Síndrome do intestino irritável
- Doença inflamatória intestinal
- Síndromes metabólicas
- Obesidade ↘
- Diabetes
- Esclerose múltipla
- Sintomas de Parkinson
- Alergia e auto-imunidade



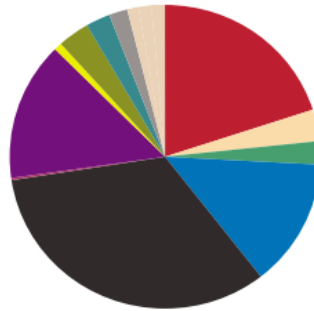
Diversidade Bacteriana na Doença

B. ovatus
B. vulgatus

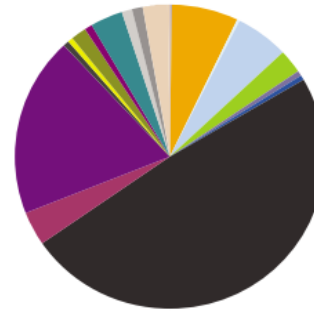
Twin study of Crohn's disease
J Dicksved *et al*



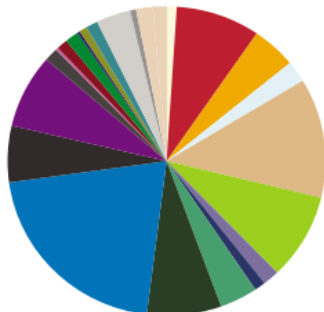
H (4a)



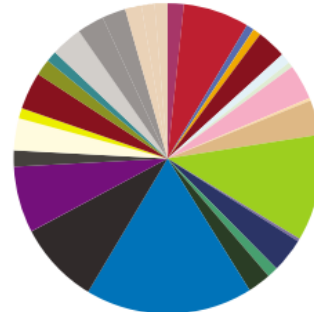
CD (18a)



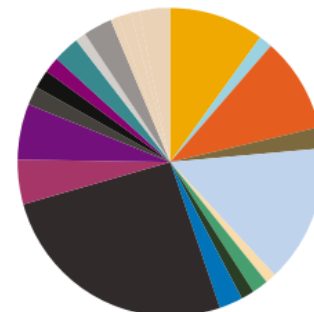
CD (15a)



H (4b)
Healthy



H (18b)
Discordant



CD (15b)
Concordant

B. uniformis

Chron disease: gêmeos monozigóticos

Microbiota no tratamento/prevenção

Probiótico

O fato da microbiota intestinal poder ser alterada e trazer benefícios à saúde humana, tem motivado o desenvolvimento de ingredientes alimentícios chamados “funcionais”.



Alimentos Funcionais

Probiótico / Prebiótico

Probiótico

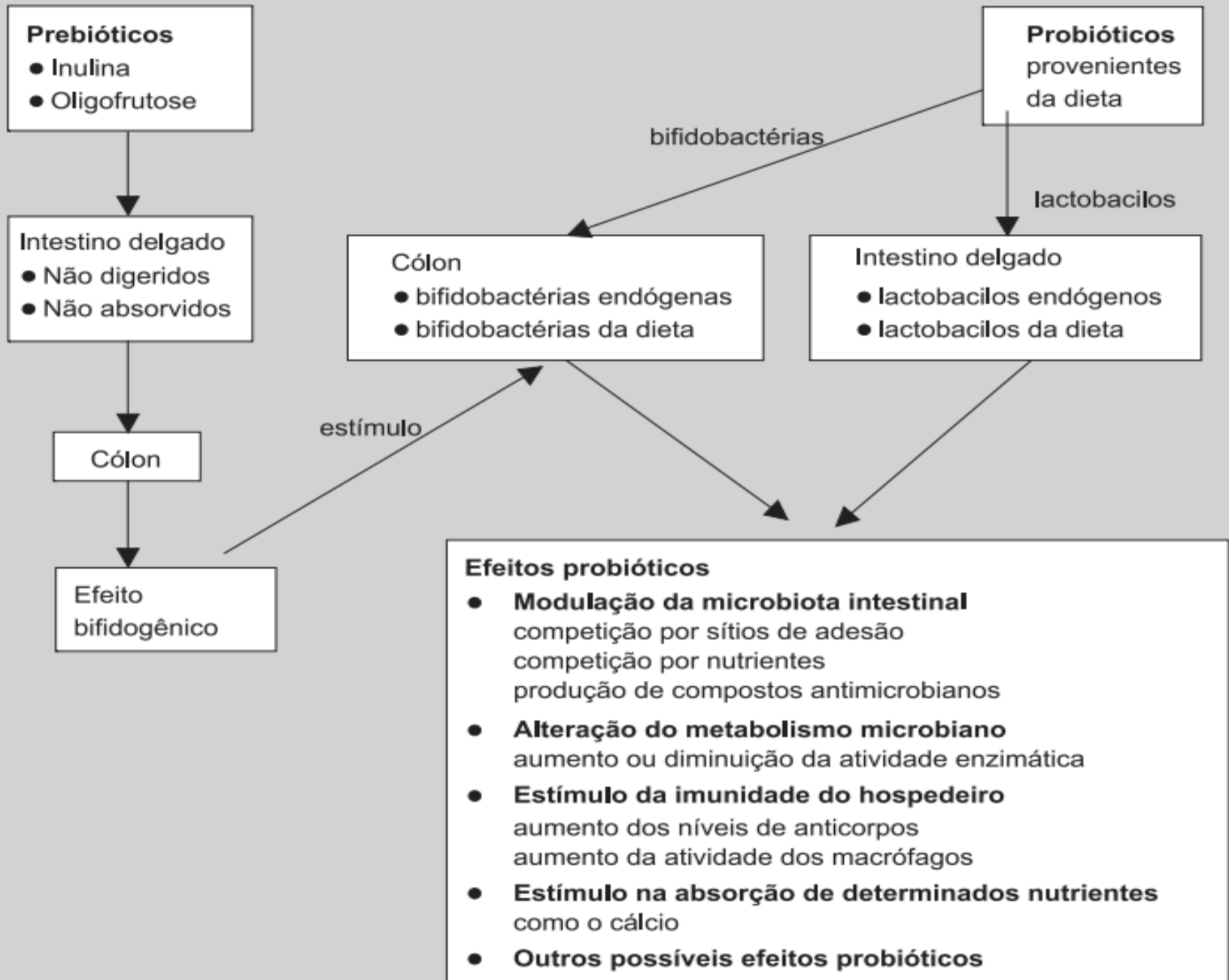
Alimentos “pró-bióticos” contêm bactérias vivas como suplemento alimentar, o que melhora o equilíbrio da microbiota intestinal, trazendo benefícios ao hospedeiro (Fuller 1989).

Prebiótico

Alimentos “pré-bióticos” são aqueles não-digeríveis pelo ser humano mas que promovem a seleção das espécies benéficas e limitam o número de bactérias no cólon, beneficiando assim o hospedeiro (Gibson and Roberfroid 1995).

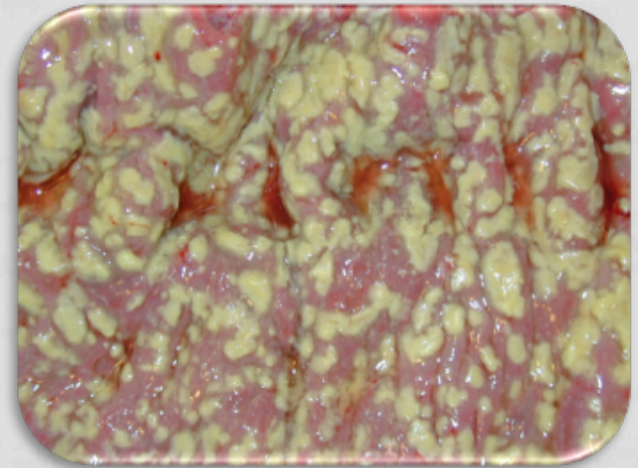
Simbiótico

Combinação de
probiótico e prebiótico



Microbiota no tratamento Transplante Fecal (FMT)

- **Processo de transplante de microbiota fecal de um indivíduo saudável para um receptor**
- 1958* - Colorado (EUA): quatro pacientes criticamente comprometidos com colite pseudomembranosa fulminante
- 2000 – Cepas multirresistentes de *C. difficile*, 3 milhões de casos novos, 300 evoluem para morte por dia (EUA e Europa). Custo anual de US\$ 1 bilhão por ano só nos EUA.



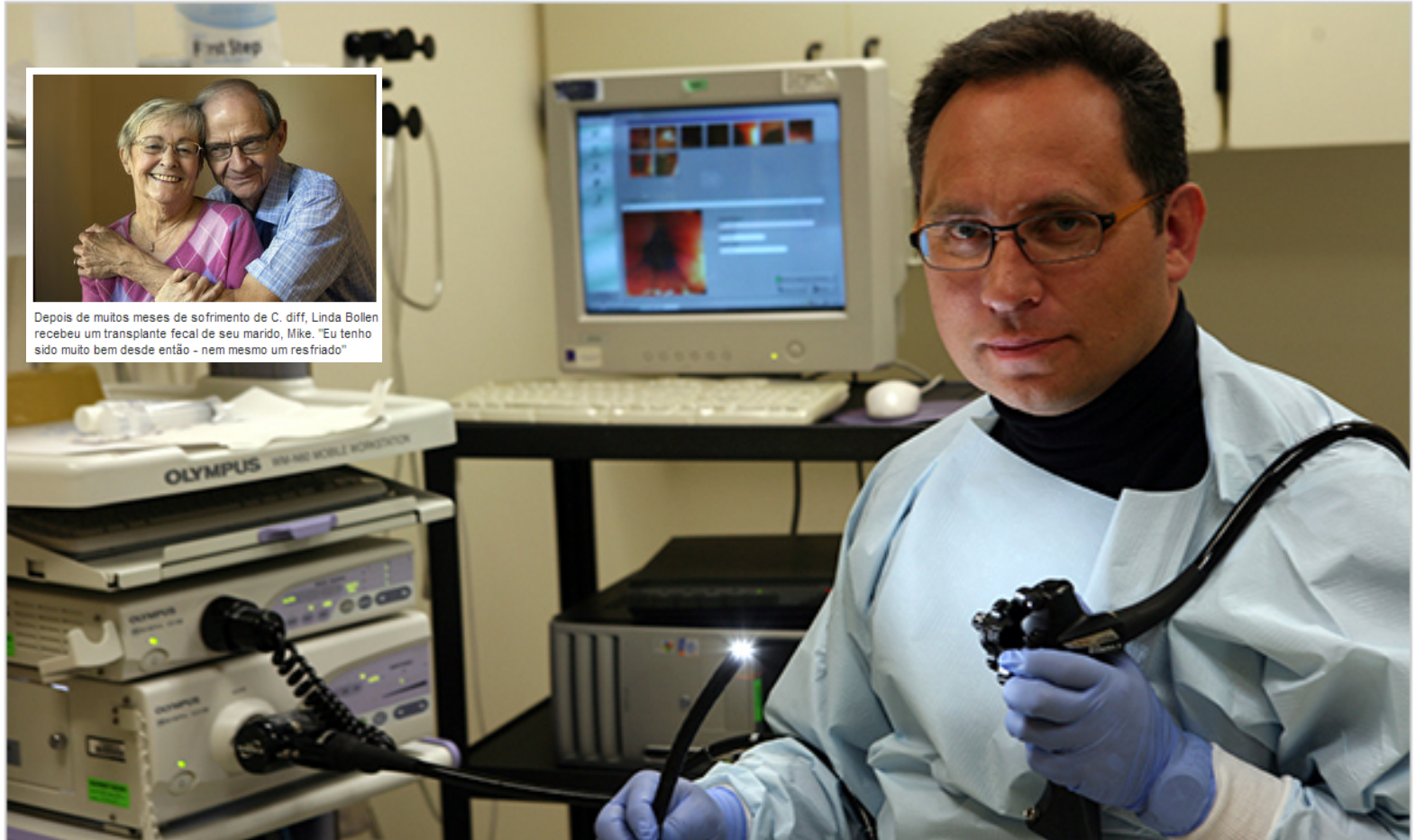
A substituição de componentes em falta (vitaminas, etc.) e a produção de produtos antimicrobianos pela “nova microbiota” tendem a ser os mecanismos de cura

*EISEMAN B, SILEN W, BASCOM GS, KAUVAR AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. Surgery. 1958 Nov;44(5):854-9.

Transplante Fecal



Depois de muitos meses de sofrimento de *C. diff*, Linda Bollen recebeu um transplante fecal de seu marido, Mike. "Eu tenho sido muito bem desde então - nem mesmo um resfriado"



Allen Brisson-Smith for The New York Times

Dr. Alexander Khoruts, a gastroenterologist at the University Minnesota, used bacteriotherapy to help cure a patient suffering from a gut infection.

Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Gastroenterol 2010; 44: 354-360.

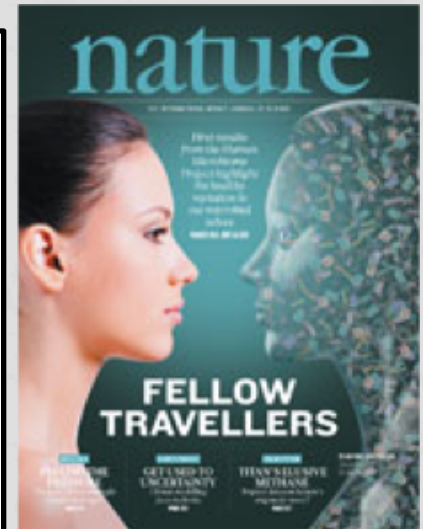
Projeto Microbioma Humano

"Indivíduo Saudável"

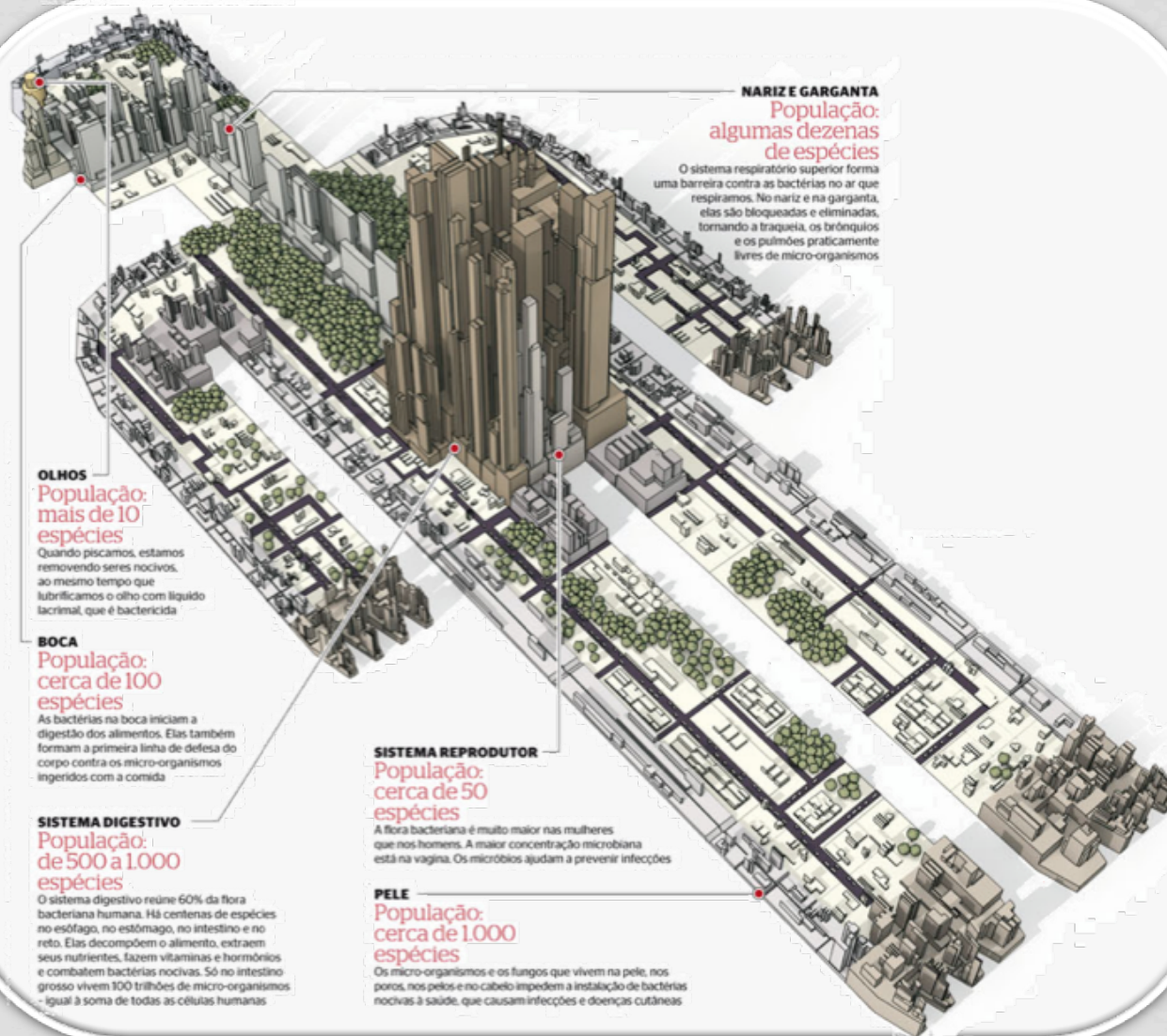
- 100 trilhões de microrganismos
- 10 vezes mais células procariontes
- 1-3% do peso corporal
- Mais de 10.000 espécies microbianas
- Genoma humano possui 22.000 genes
- Microbioma contribui cerca de 8 milhões de genes
- 360 vezes mais material genético

80-95% não cultiváveis *in vitro*

O Programa:
\$173 milhões
300 indivíduos saudáveis
18 locais de coleta no corpo
7 anos (2007 – 2014)
80 Universidades



Metrópole bacteriana



Human Microbiome Project
2007-2014

Metagenômica oral

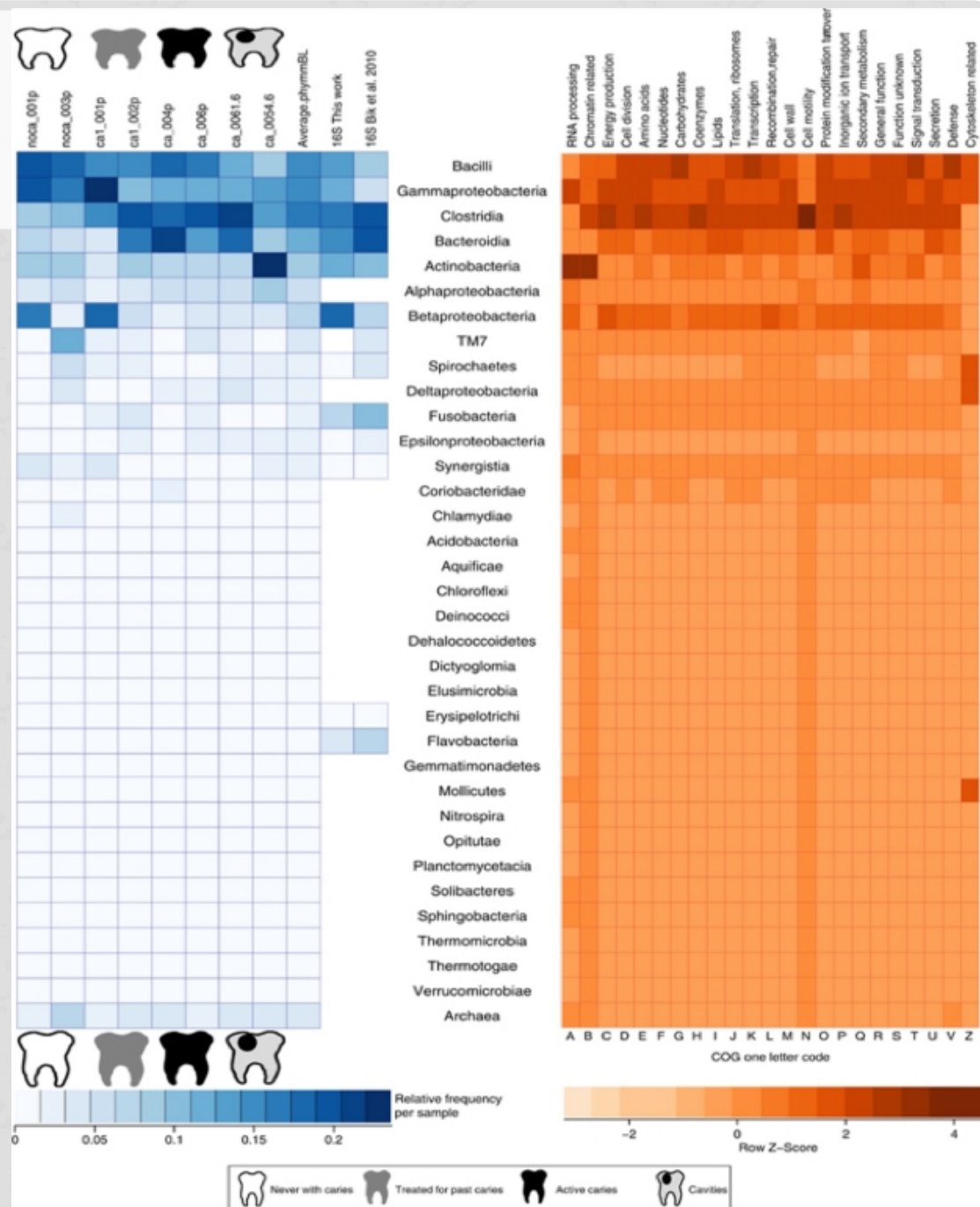
Diversidade de bactérias da cavidade oral (1Gbp sequenciados).

À esquerda: diversidade taxonômica na amostra (frequência relativa dos taxons)

À direita: contribuição relativa de cada grupo para o repertório de genes codificantes do ecossistema bucal

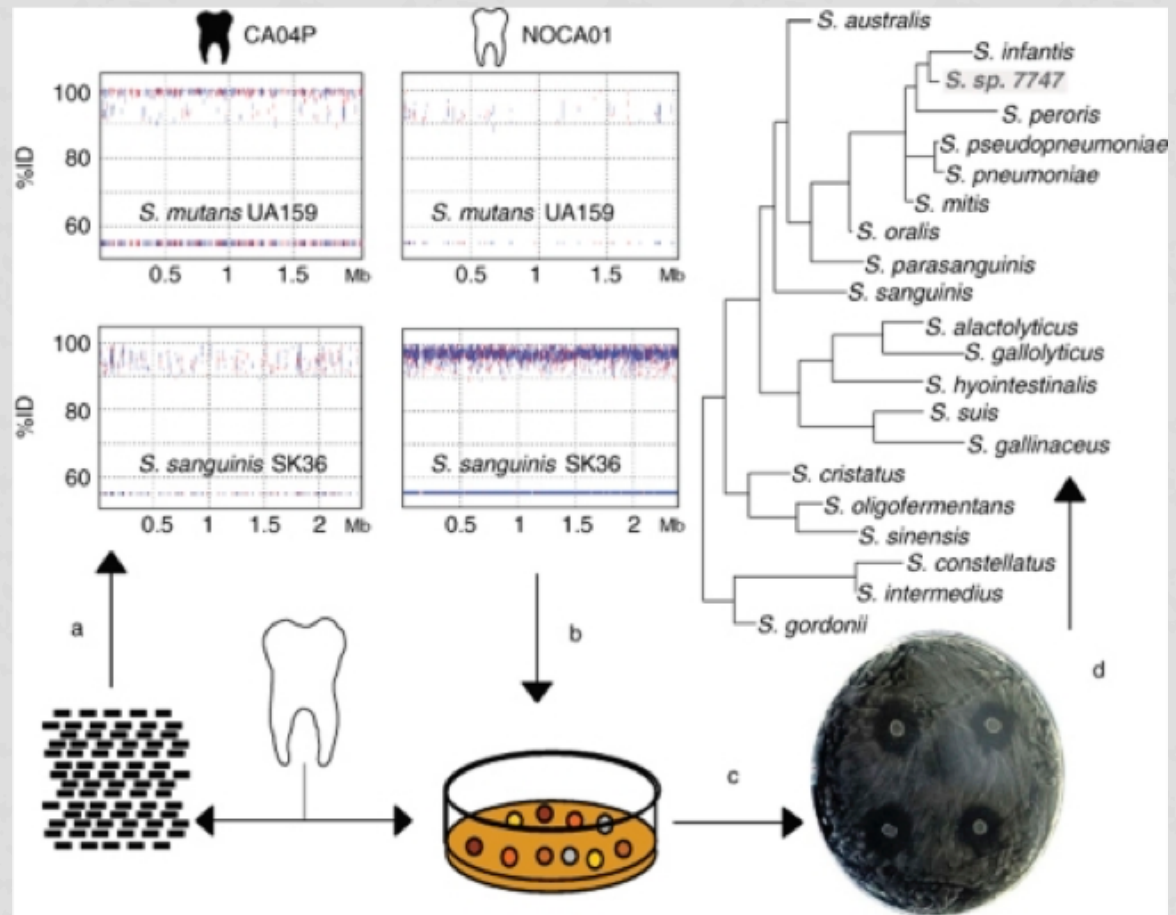
A análise revelou que indivíduos sadios possuem microbiota bucal com excesso de genes para **percepção da população** ("quorum sensing") e **peptídeos antimicrobianos**

Belda-Ferre *et al* (2012) **The oral metagenome in health and disease**. ISME J. 2012 January; 6(1): 46–56. doi: 10.1038/ismej.2011.85



Metagenômica oral

- Os autores procuraram bactérias com atividade anti-cárie entre as bactérias menos frequentes na boca de indivíduos doentes e mais abundantes na boca dos saudáveis.
- Encontraram uma linhagem de *S. sanguinis* nos pacientes saudáveis

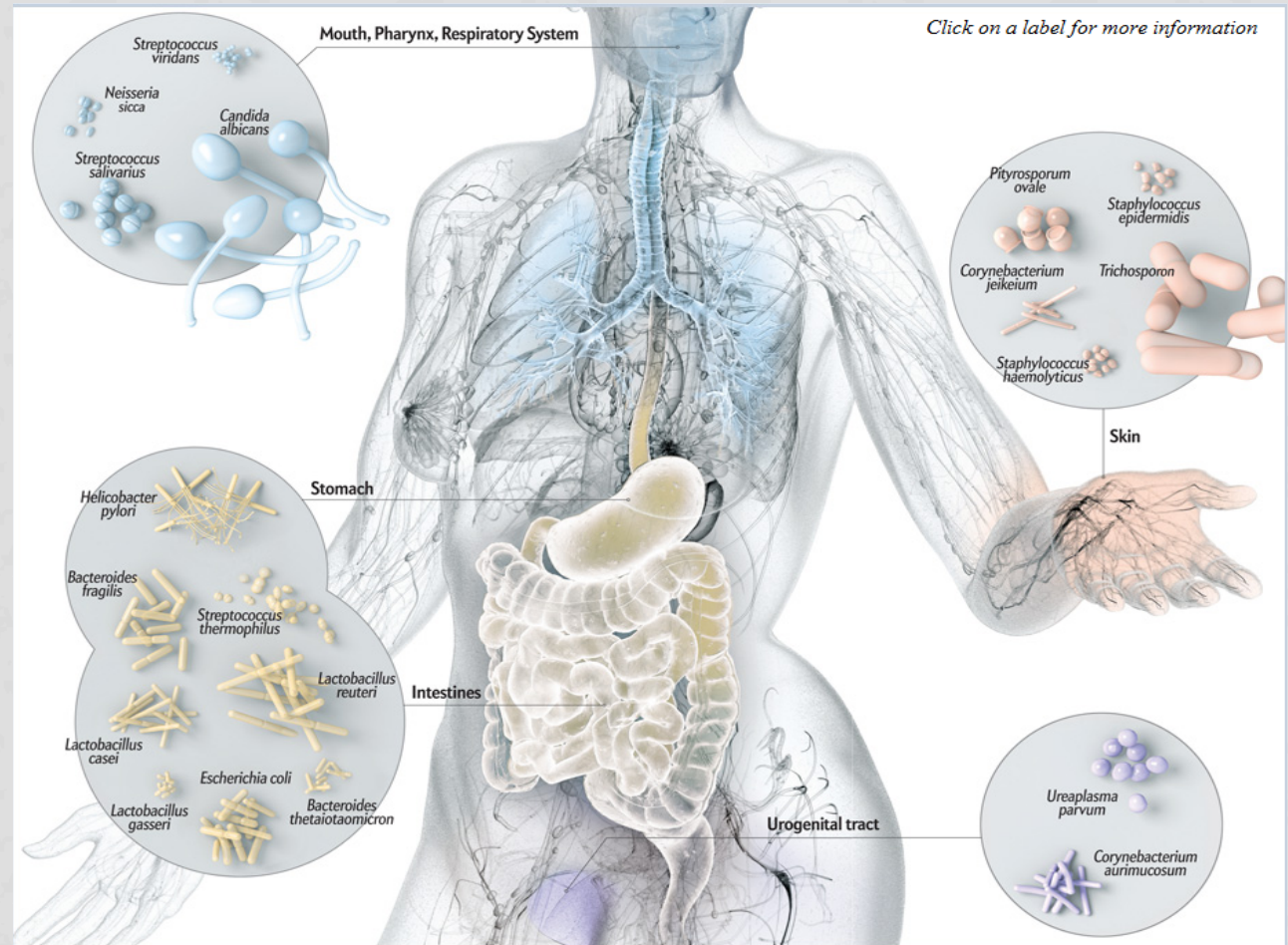


Belda-Ferre et al (2012) **The oral metagenome in health and disease**. ISME J. 2012 January; 6(1): 46–56. doi: 10.1038/ismej.2011.85

Nova visão da microbiota

A microbiota humana como um **orgão**

O corpo humano como um **ecossistema**



F. Baquero and C. Nombela (2012) *The microbiome as a human organ*. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18** (Suppl. 4): 2–4. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x

Referências

- **Diversidade**

- Introdução à Microbiologia (Tortora, 11ª edição)
 - Capítulo 10: Classificação de microorganismos
 - Capítulo 11: Os procariotos
- Microbiologia de Brock (13ª edição)
 - Unidade 6: Evolução e diversidade de microorganismos
 - Capítulo 16 – Evolução microbiana e sistemática
 - Capítulo 17 – Bactérias: as proteobactérias
 - Capítulo 18 – Outras bactérias

- **Microbiota humana**

- Microbiologia Médica (Murray, Rosenthal & Pfaller, 7a. Edição)
 - Capítulo 2: Flora Microbiana Comensal e Paragênica em Humanos
- Microbiologia (Trabulsi & Alterthum, 4a. Edição)
 - Capítulo 12: Microbiota ou Flora Normal do Corpo Humano

Bibliografia

- The human microbiome: at the interface of health and disease. (*Nature Reviews Genetics* 13, 260-270 (April 2012) | doi:10.1038/nrg3182);
- Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. (*Nature Reviews Genetics* 13, 47-58 (January 2012) | doi:10.1038/nrg3129);
- Sequencing technologies — the next generation. (*Nature Reviews Genetics* 11, 31-46 (January 2010) | doi:10.1038/nrg2626);
- Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. (*Nature* 486, 207–214 (14 June 2012) doi:10.1038/nature11234);
- A core gut microbiome in obese and lean twins. (*Nature* 457, 480-484 (22 January 2009) | doi:10.1038);
- Therapeutic Modulation of Microbiota-Host Metabolic Interactions. (*Sci. Transl. Med.* DOI: 10.1126/scitranslmed.3004244);
- The Gut Microbiota. (DOI: 10.1126/science.336.6086.1245);