



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

Tópicos

- **Taxonomia de Procaríotos**

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

Eukarya

Archaea

Bacteria

Reino

Fungi

Não é usado

Não é usado

Filo

Ascomycota

Euryarcheota

Proteobacteria

Classe

Hemiascomycetes

Methanococci

Gamma proteobacteria

Ordem

Saccharomycetales

Methanococcales

Enterobacteriales

Familia

Saccharomycetaceae

Methanococcaceae

Enterobacteriaceae

Gênero

Saccharomyces

Methanothermococcus

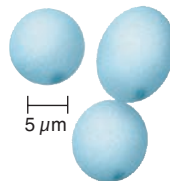
Escherichia

Espécie

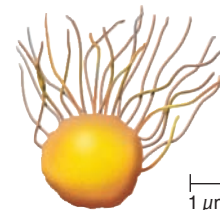
S. cerevisiae

M. okinawensis

E. coli



Baker's yeast



Methanococcus

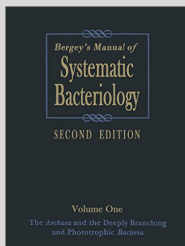


0.5 μm

E. coli



CARL LINNAEUS



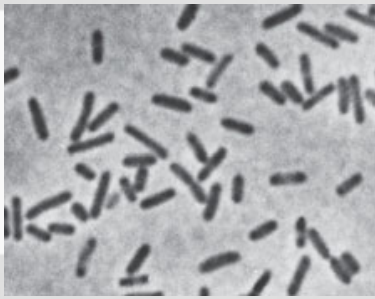
Bergey's Manual of
Systematic
Bacteriology

SECOND EDITION

Volume One

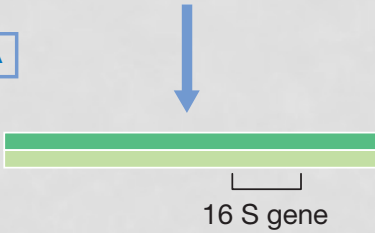
The Archaea and the Deeply Branching
and Phototrophic Bacteria

Métodos genotípicos filogenia do rRNA 16S



Norbert Pfenning

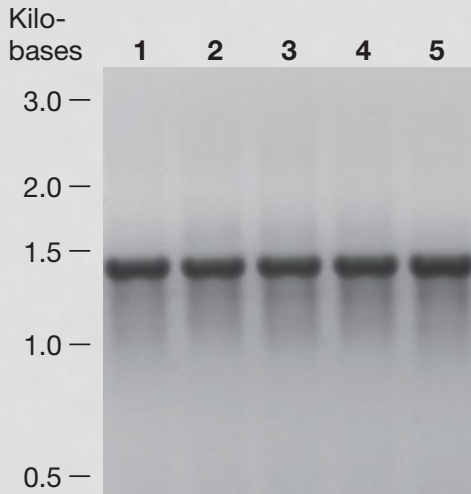
Isolate DNA



Amplify 16S gene by PCR

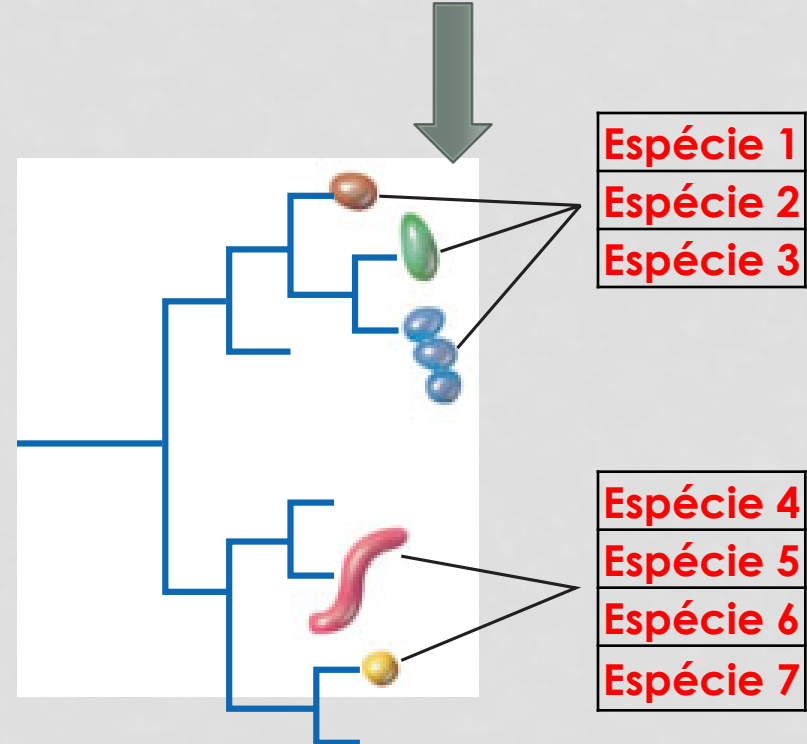
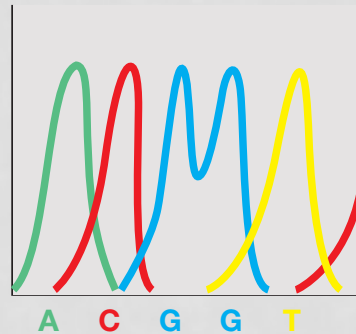


Run on agarose gel; check for correct size

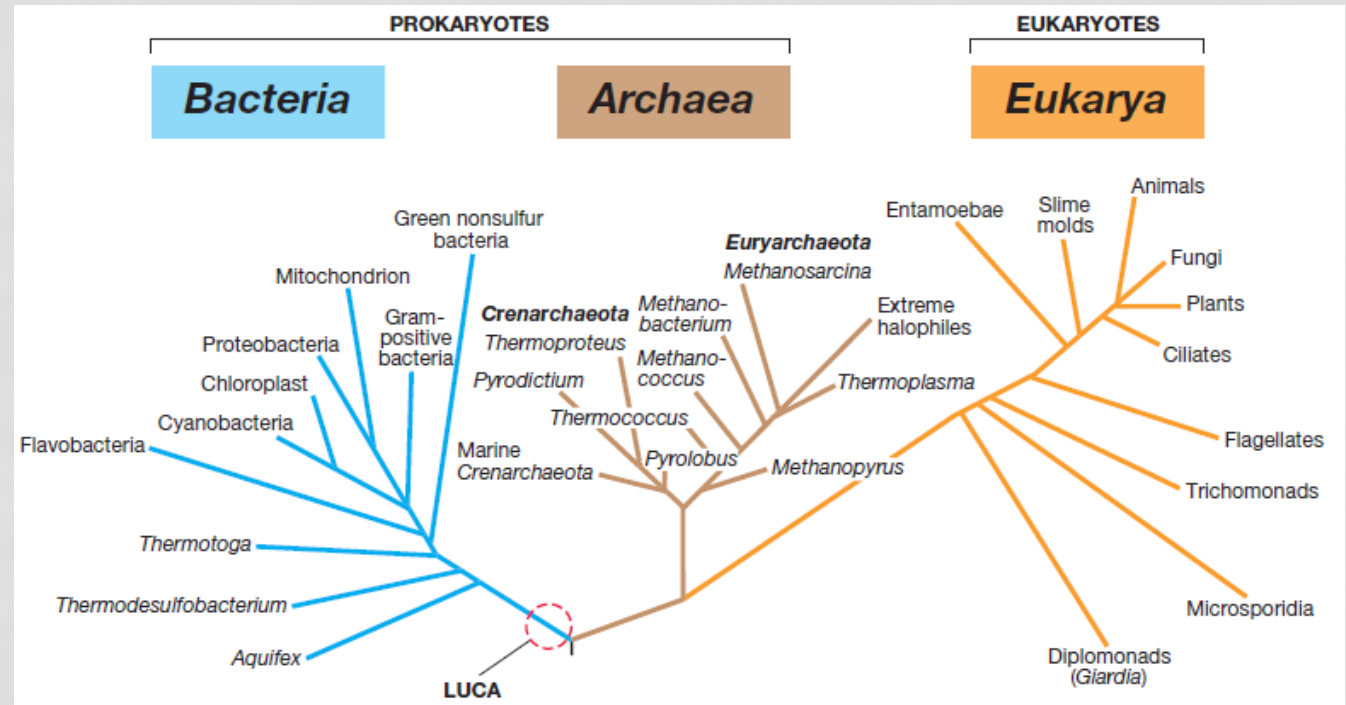


Jennifer Ast and Paul Dunlap

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



Carl Woese: os três domínios da vida



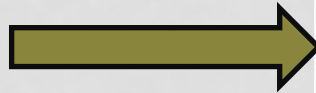
- Revolução na classificação da vida
- Transição da classificação baseada em fenótipo para uma baseada em genótipo
- Separação entre Bactérias e Arqueas

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.

Árvore da vida

Publicada em 2018

CPR



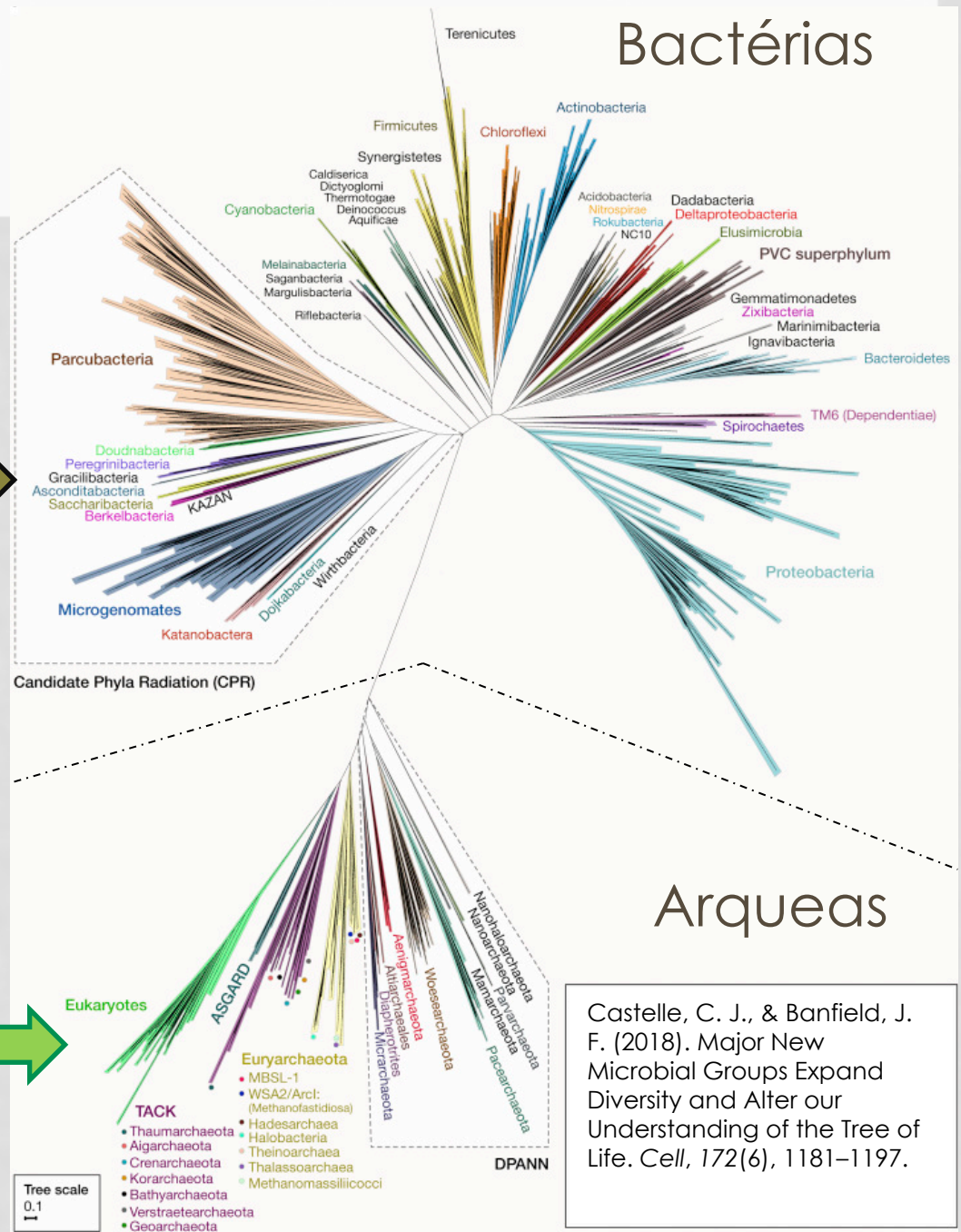
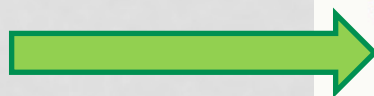
Novos tipos de bactérias

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

<http://itol.embl.de>

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

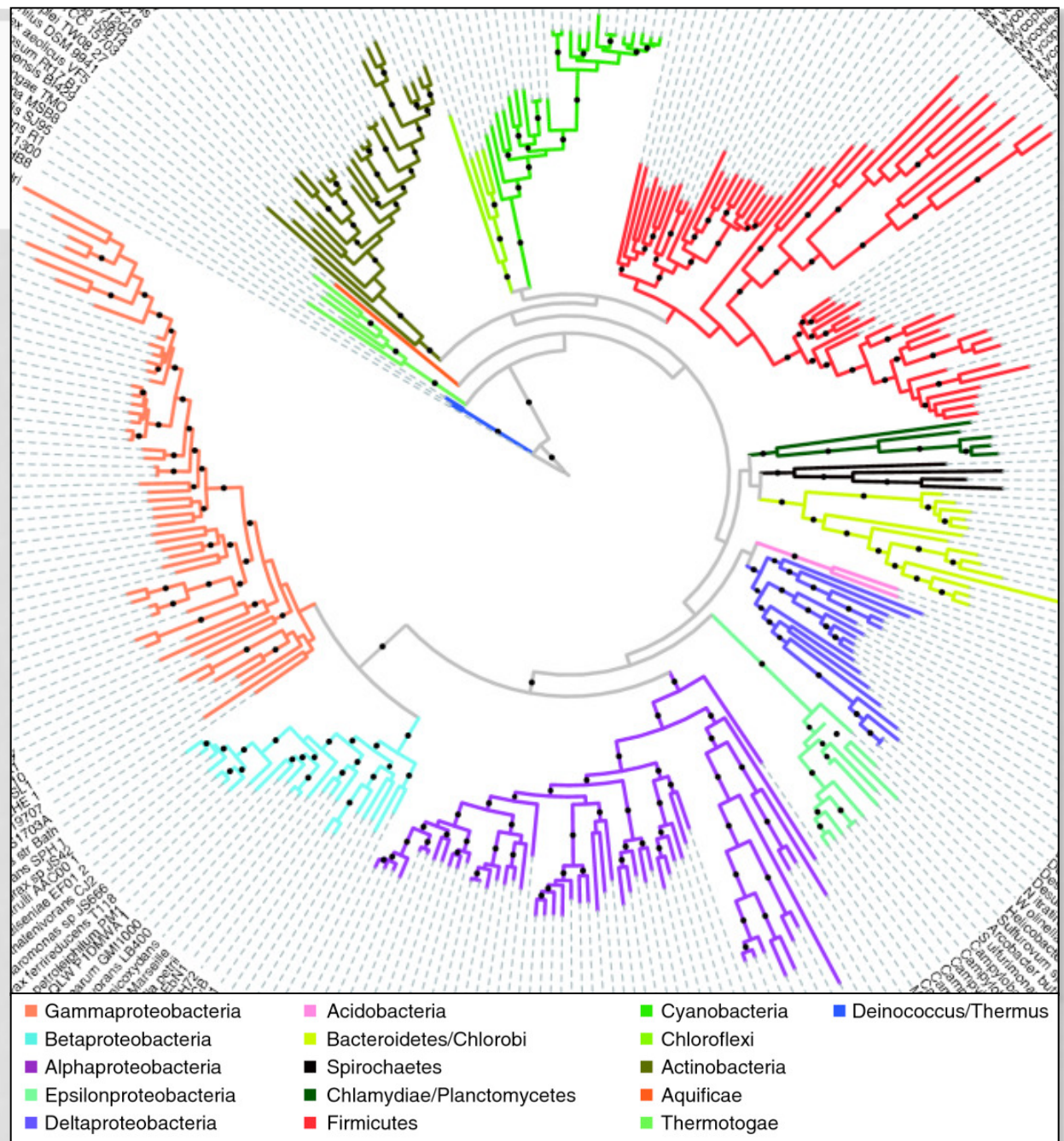
Eucariotos



Castelle, C. J., & Banfield, J. F. (2018). Major New Microbial Groups Expand Diversity and Alter our Understanding of the Tree of Life. *Cell*, 172(6), 1181–1197.

Filogenia das Bacterias

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



Bactérias

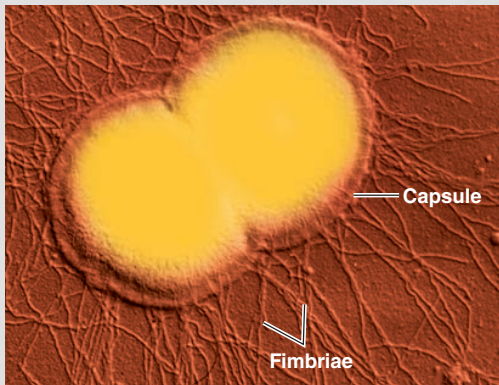
Grupos principais de bactérias

Classificação baseado principalmente na sequência do rRNA

- Proteobactérias
- Cianobactérias
- Espiroquetas
- Clamídias

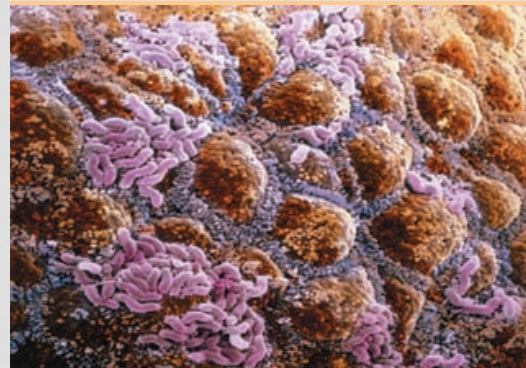
Proteobactérias

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



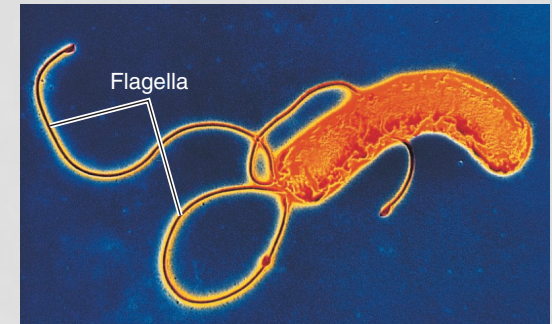
Neisseria gonorrhoea
causa gonorrhea

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



Escherichia coli
comensal, gastroenterite

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

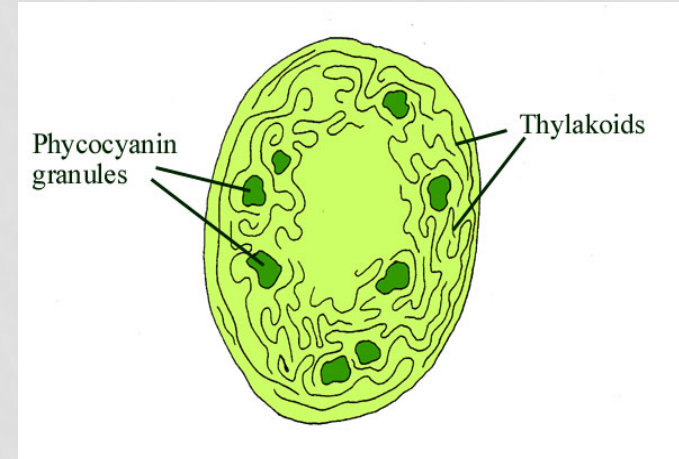
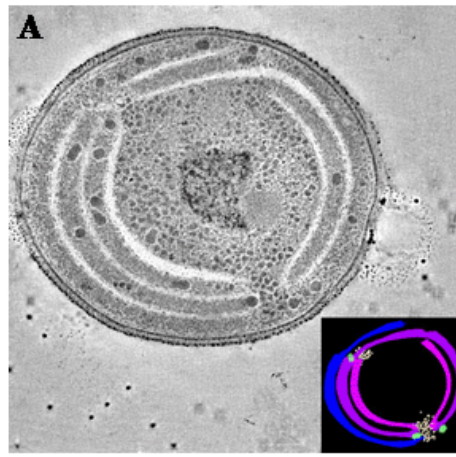


Helicobacter pylori
úlceras, cancer estomacal

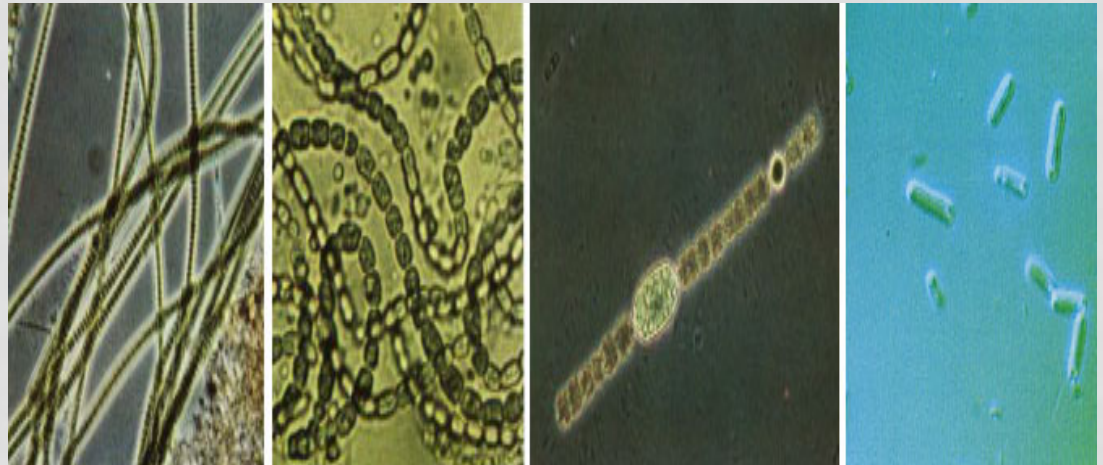
Domínio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Classe	Epsilonproteobacteria
Ordem	Campylobacterales
Família	Helicobacteraceae
Gênero	<i>Helicobacter</i>
Espécie	<i>H. pylori</i>

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

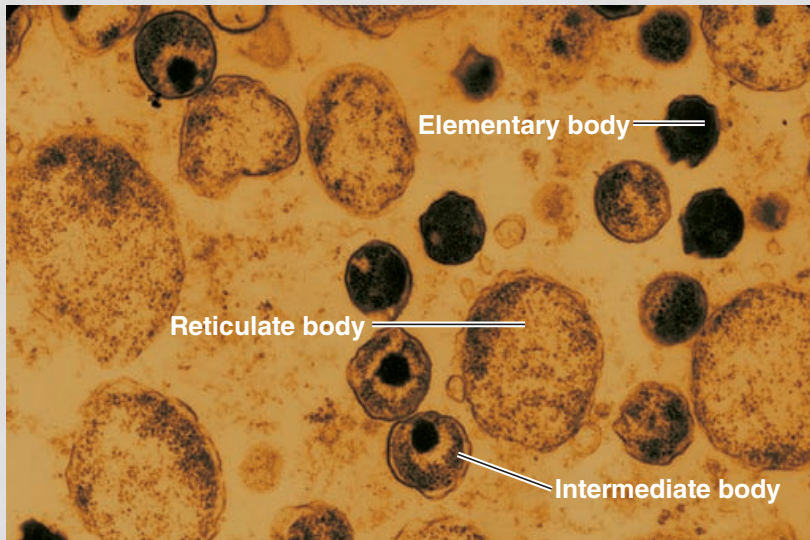


Treponema pallidum
causador da sífilis

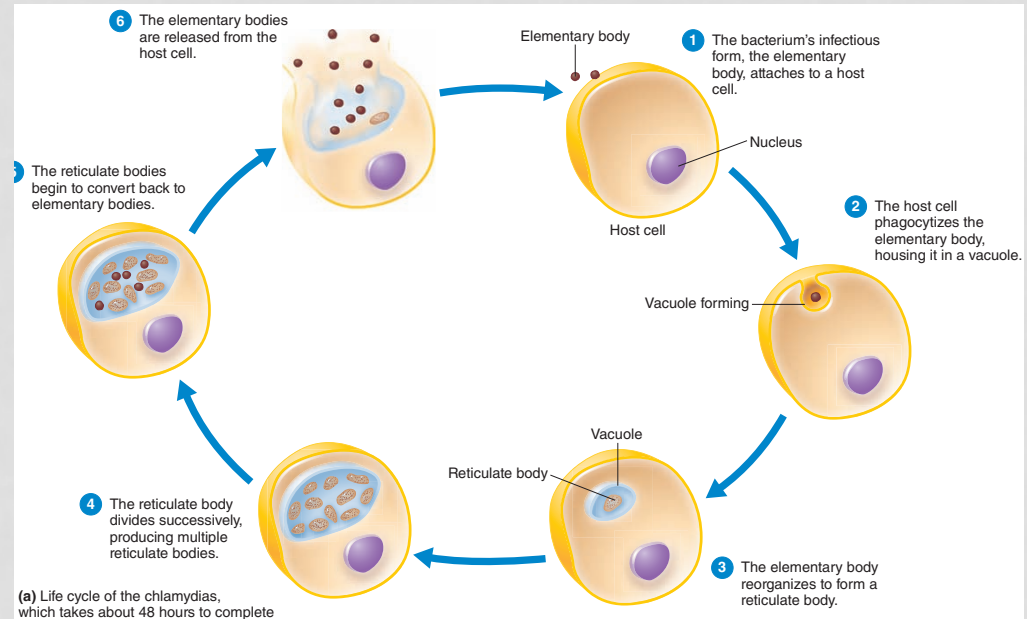
Bactérias

Clamídias

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



TEM 0.3 μm



Exemplo: *Chlamydia trachomatis*

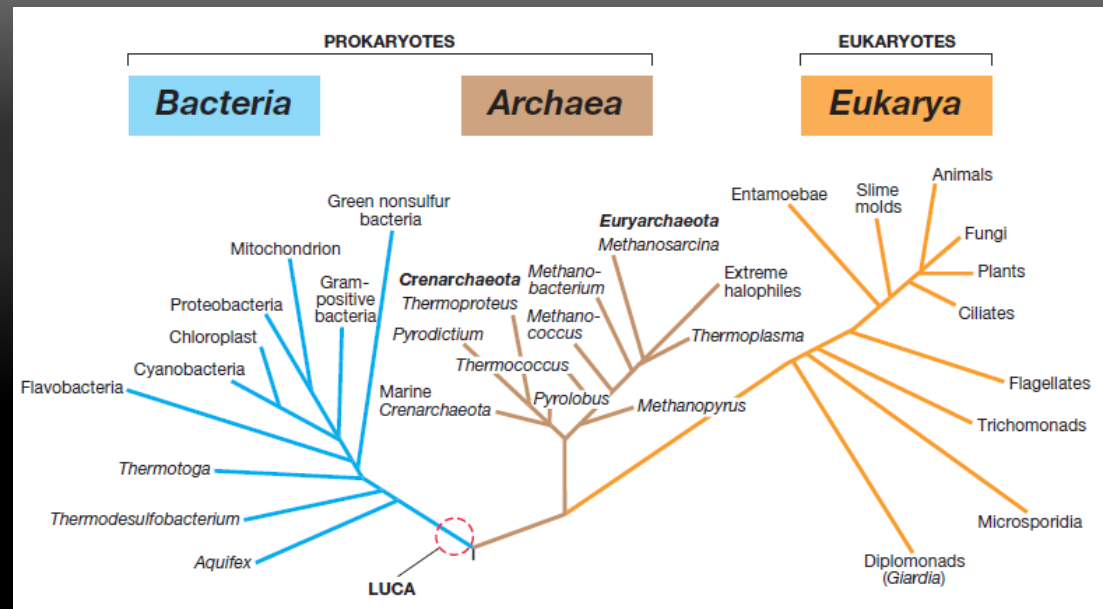
Maior causa de cegueira no mundo

Também causa uretrite (doença sexualmente transmitida)

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.

Sinônimos

Microbiota indígena

Microbiota autóctone

Microbiota residente

Composição

- Bactérias indígenas

Mais de 1% da microbiota total

- Bactérias suplementares

Menos de 1% da microbiota total

Microbiota

Tipos

- **Microbiota transitória, alóctone ou exógena**

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, mas que podem ganhar uma vantagem competitiva quando a população de competidores é diminuída. Exemplos:

- Remoção de competidores: *Clostridium difficile*;
- Deslocamento do sítio normal no corpo humano (e.g. *Staphylococcus epidermidis* em cateter);
- Indivíduos imunocomprometidos: microbiota pode multiplicar em excesso, invadir outros compartimentos 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

DETERMINANTES DA COLONIZAÇÃO MICROBIANA DE TECIDOS BIOLÓGICOS

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

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

ESTABELECIMENTO DA MICROBIOTA INDÍGENA

Recém nascido

Cavidade bucal

Trato intestinal

Trato vaginal

24 h

Aeróbios

Facultativos

Anaeróbios

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**

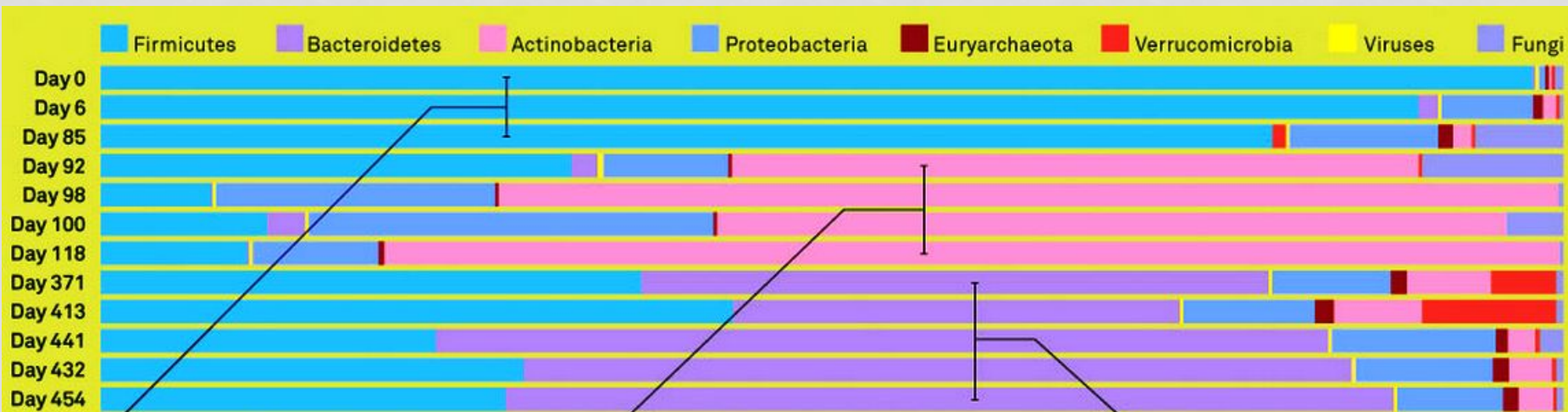
Lactobacillus, pH

15-30 dias

Microbiota~adulto

Alterações na microbiota intestinal

Primeiro ano de vida

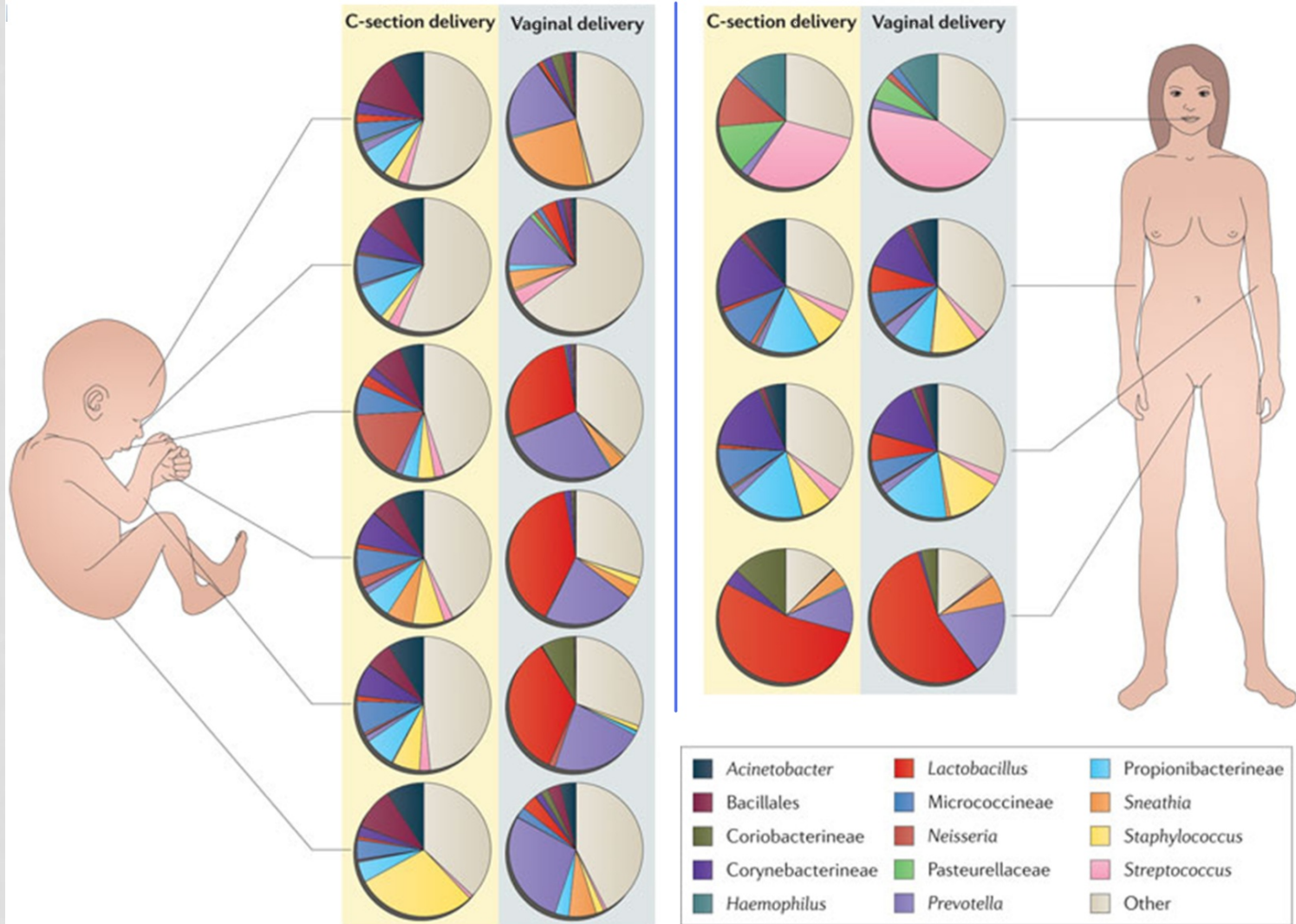


Firmicutes dominam o intestino do recém-nascido: *Lactobacillus* do leite

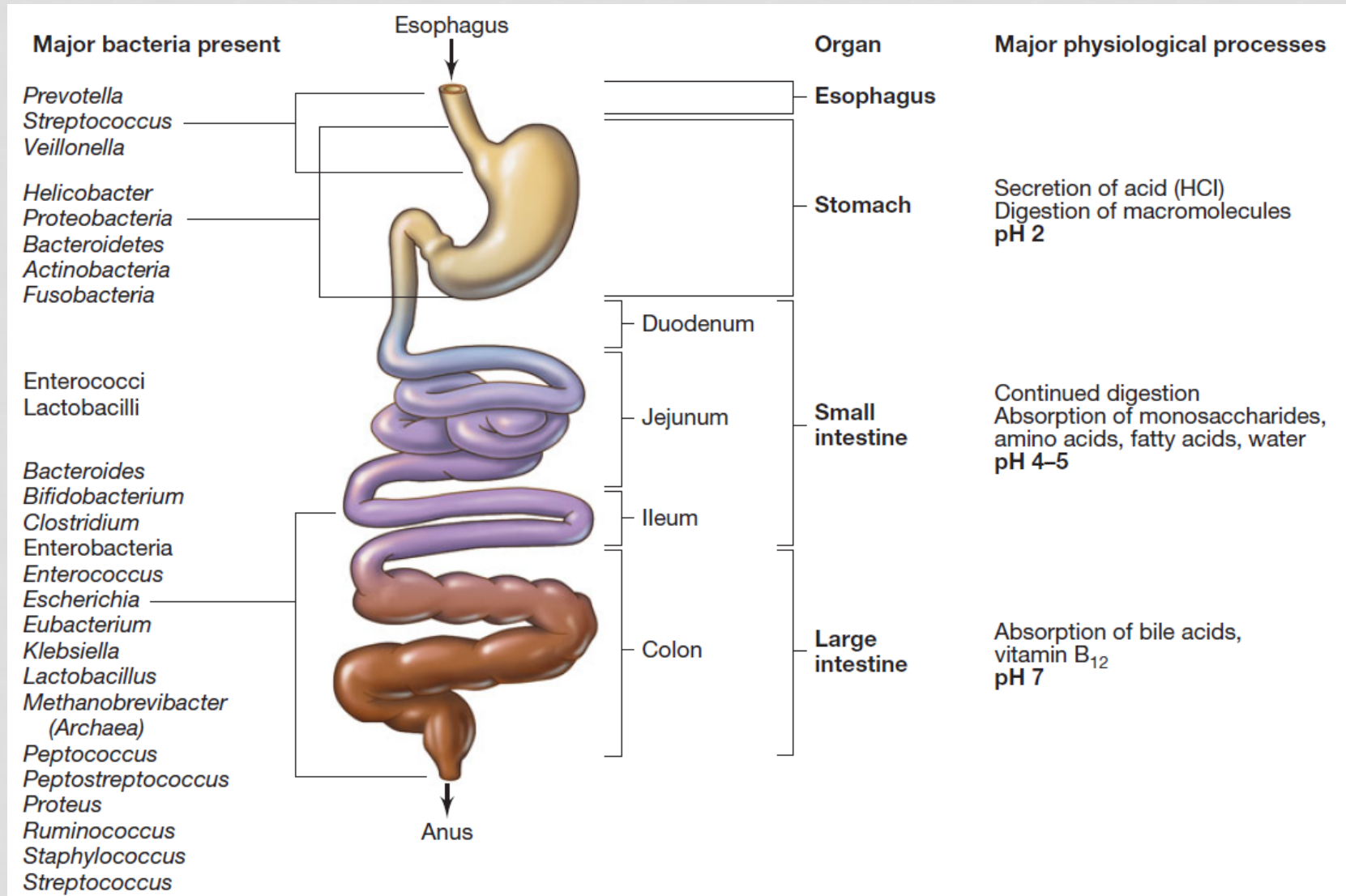
Actinobacterias se tornam comuns, talvez por causa de uma febre por volta do 92º dia

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

Cesária Vs Natural



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} /g p.s.f.)

Ruminococcus, Coprococcus, Peptostreptococcus

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

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

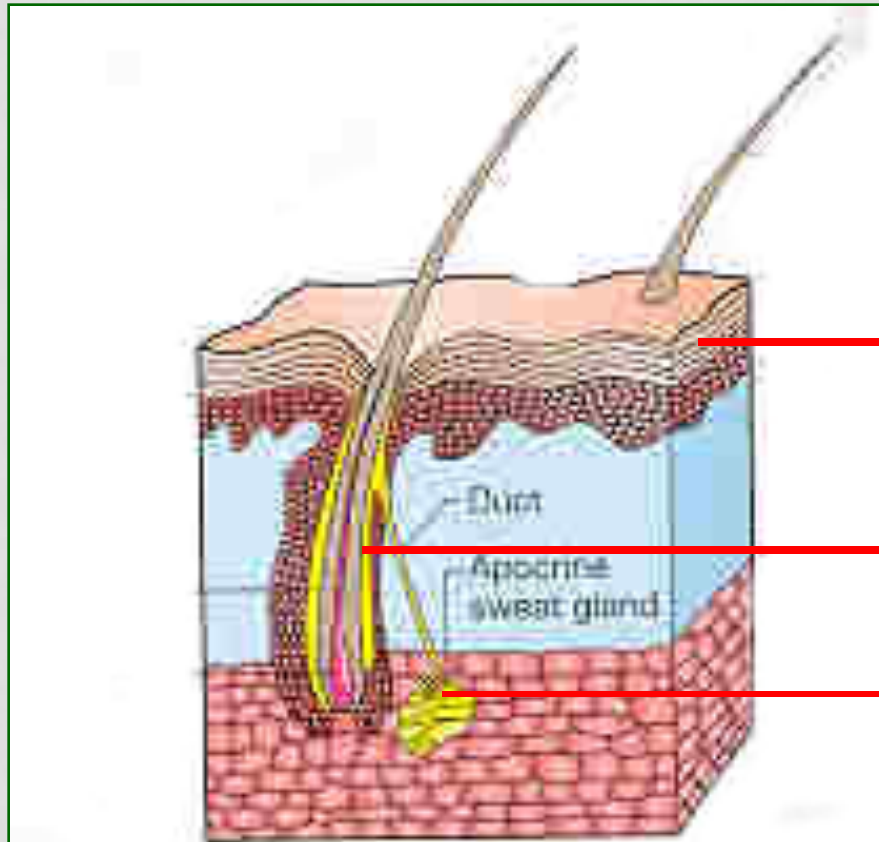
6. Outros

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.

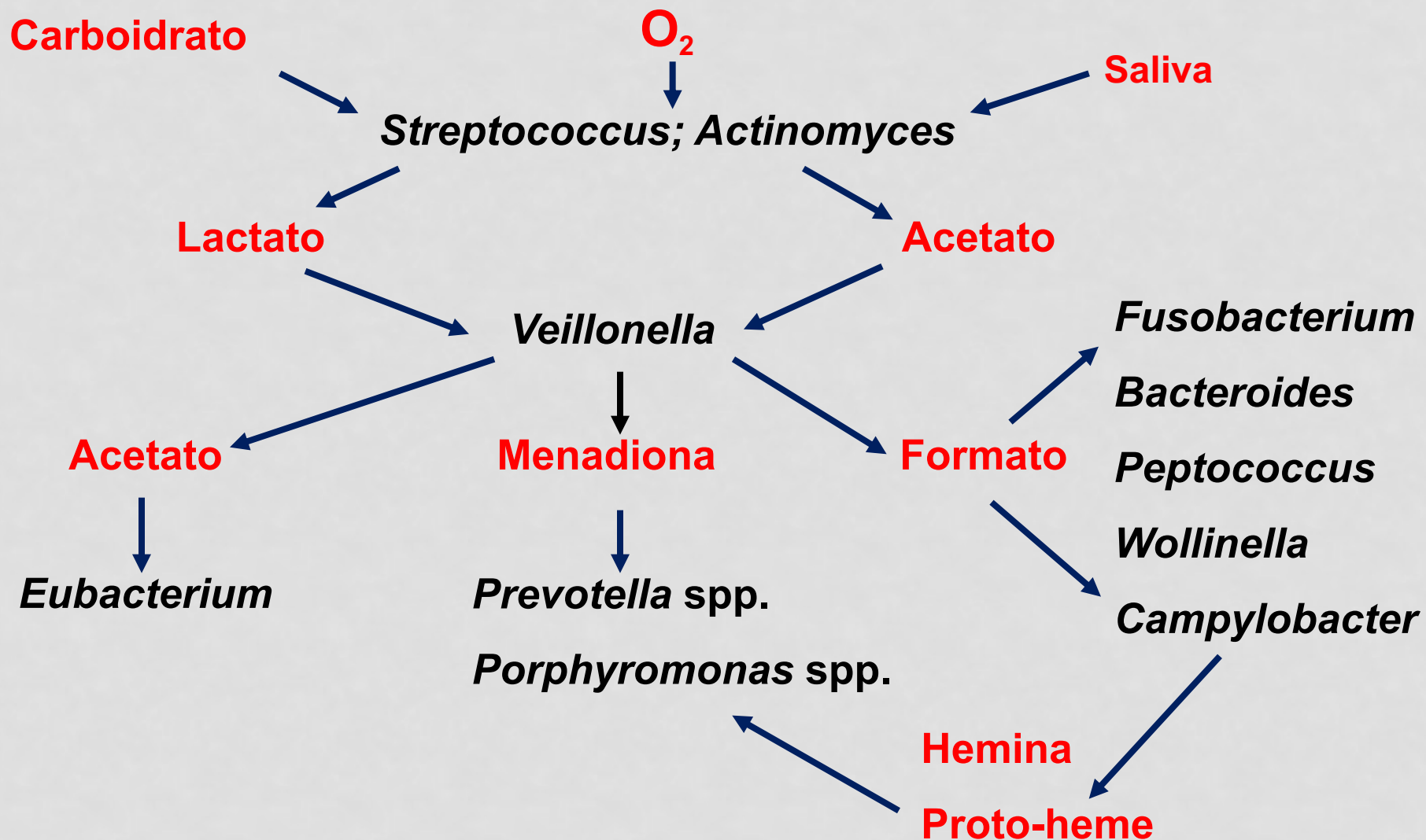
Alterações no pH 3,5-4,5, permite o crescimento de fungos e outras bacterias.

Contribuições metabólicas de micro-organismos intestinais

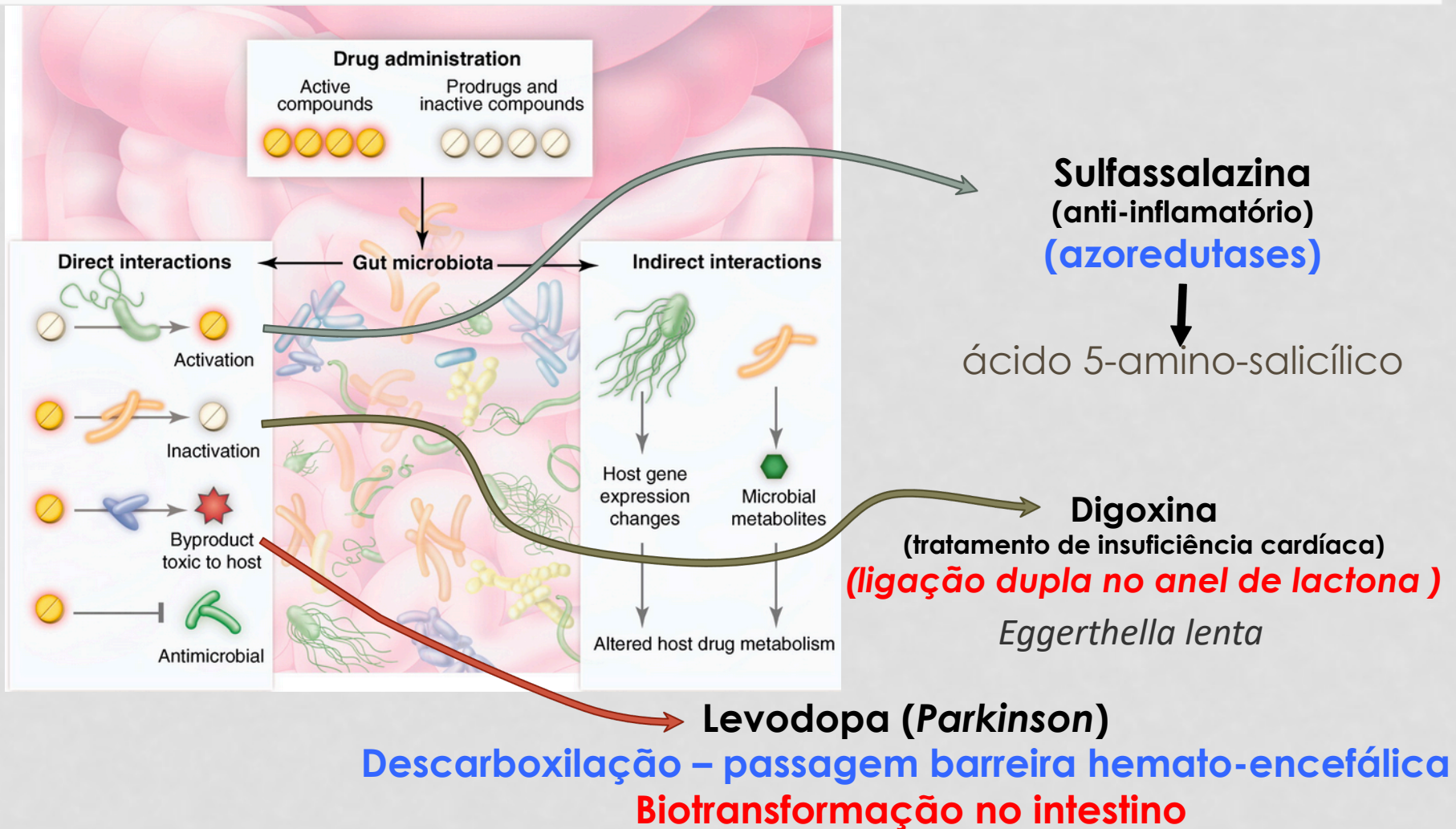
<i>Process</i>	<i>Product</i>
Vitamin synthesis	Thiamine, riboflavin, pyridoxine, B ₁₂ , K
Gas production	CO ₂ , CH ₄ , H ₂
Odor production	H ₂ S, NH ₃ , amines, indole, skatole, butyric acid
Organic acid production	Acetic, propionic, butyric acids
Glycosidase reactions	β -Glucuronidase, β -galactosidase, 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.

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>	+/-
Corynebacteria	+
Mycobacteria	+
Spirochetes	++
Mycoplasmas	+

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

Disbioses

Desequilíbrio na microbiota associado a doenças
Fatores que influenciam o equilíbrio da microbiota

Independente do comportamento do hospedeiro

Condições ambientais

Imunidade

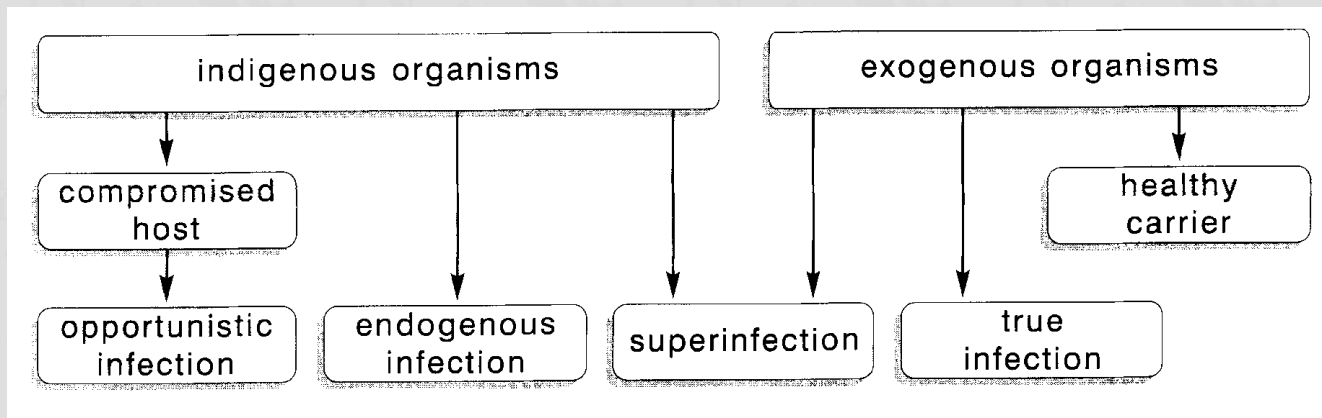
Presença de patógenos

Fatores comportamentais

Higiene

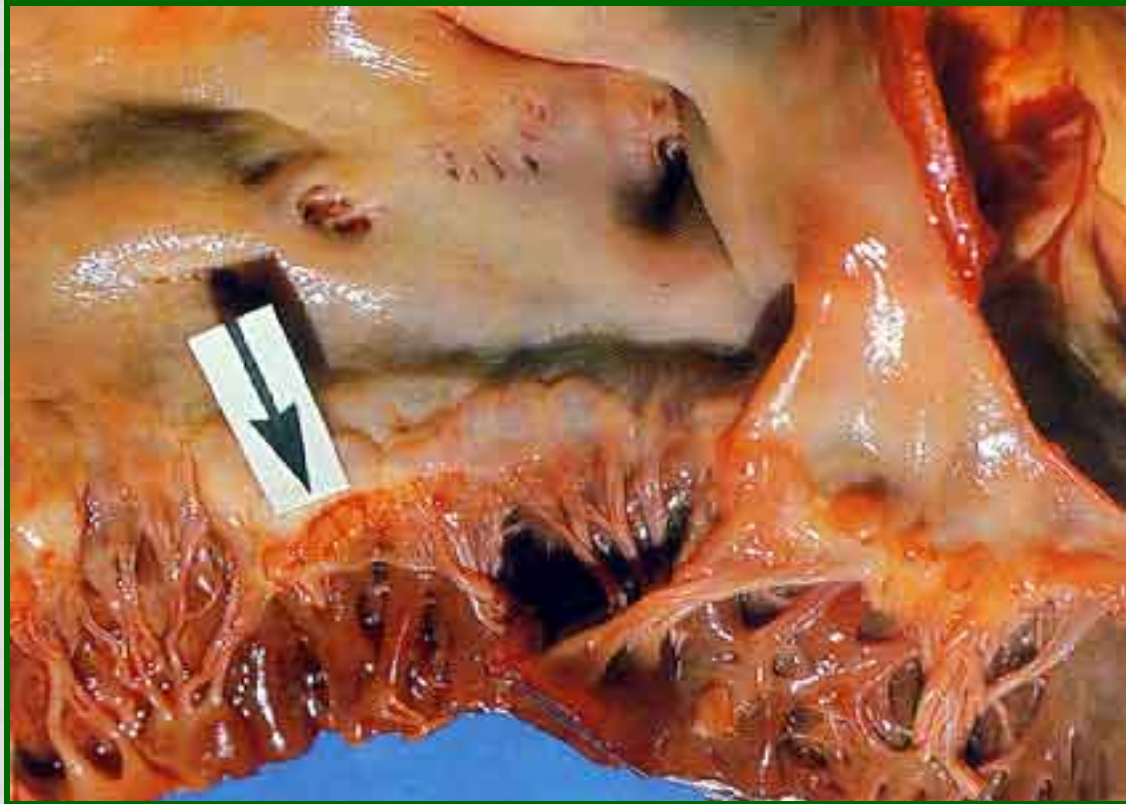
Dieta

Uso de Antimicrobianos



Participação microbiana em processos infecciosos

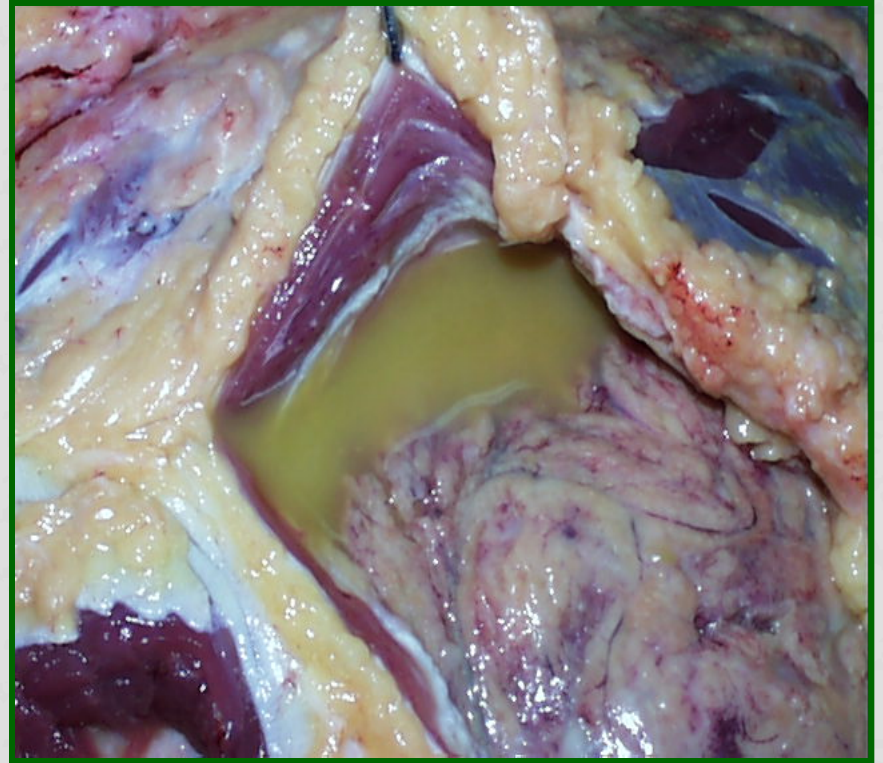
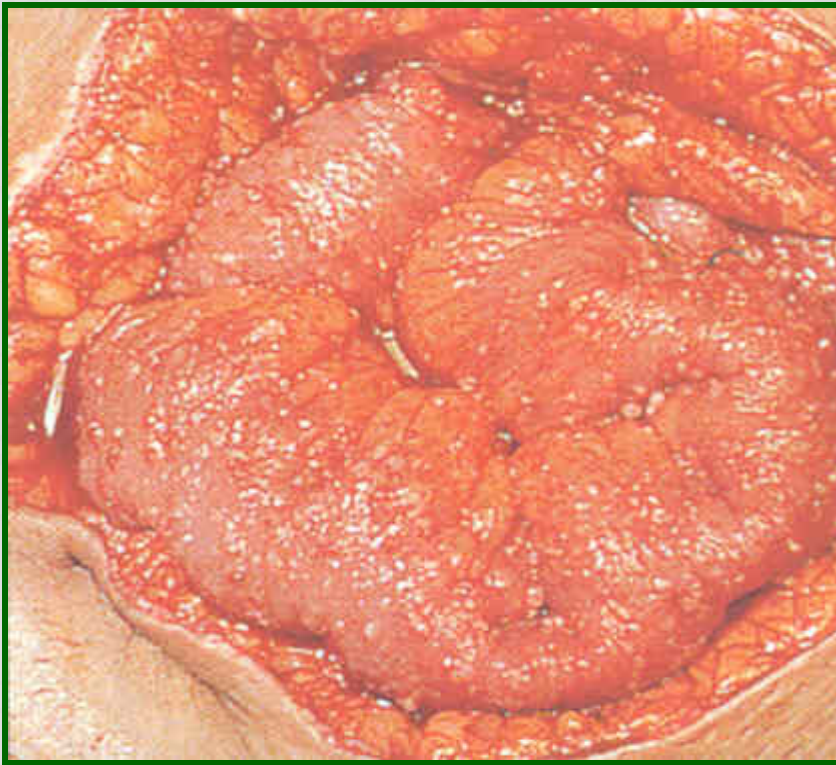
Peptococcus spp. e *Peptostreptococcus* spp.



Endocardite

Participação bacteriana em processos infecciosos

Bacteroides fragilis

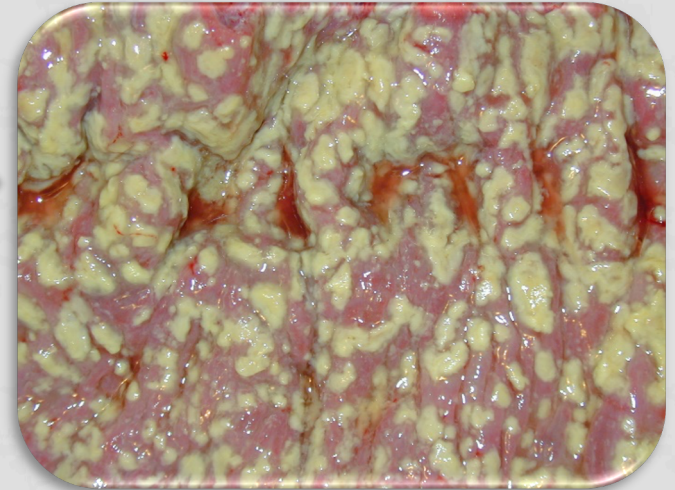


Peritonite

Microbiota intestinal

novos vínculos com doenças e disbioses emergentes

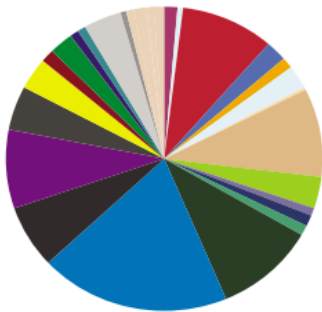
- Colite pseudomembranosa
- Colite ulcerativa →
- Síndrome do intestino irritável
- Doença inflamatória intestinal
- Síndromes metabólicas
- Obesidade ↘
- Diabetes
- Esclerose múltipla
- Sintomas de Parkinson
- Alergia e auto-imunidade



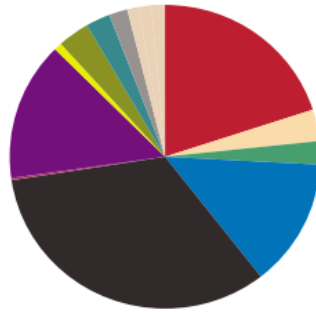
Diversidade Bacteriana na Doença

B. ovatus
B. vulgatus

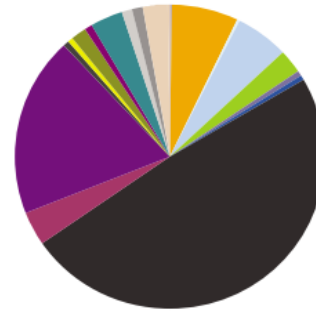
Twin study of Crohn's disease
J Dicksved *et al*



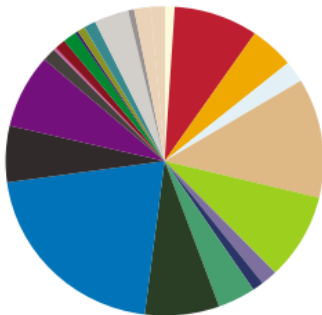
H (4a)



CD (18a)

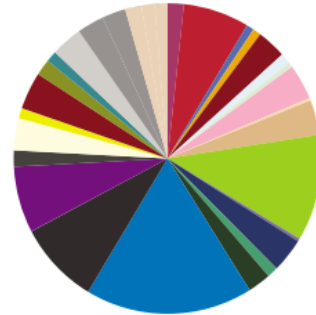


CD (15a)



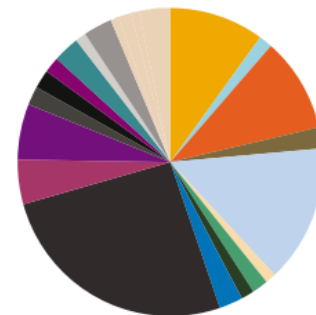
H (4b)

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

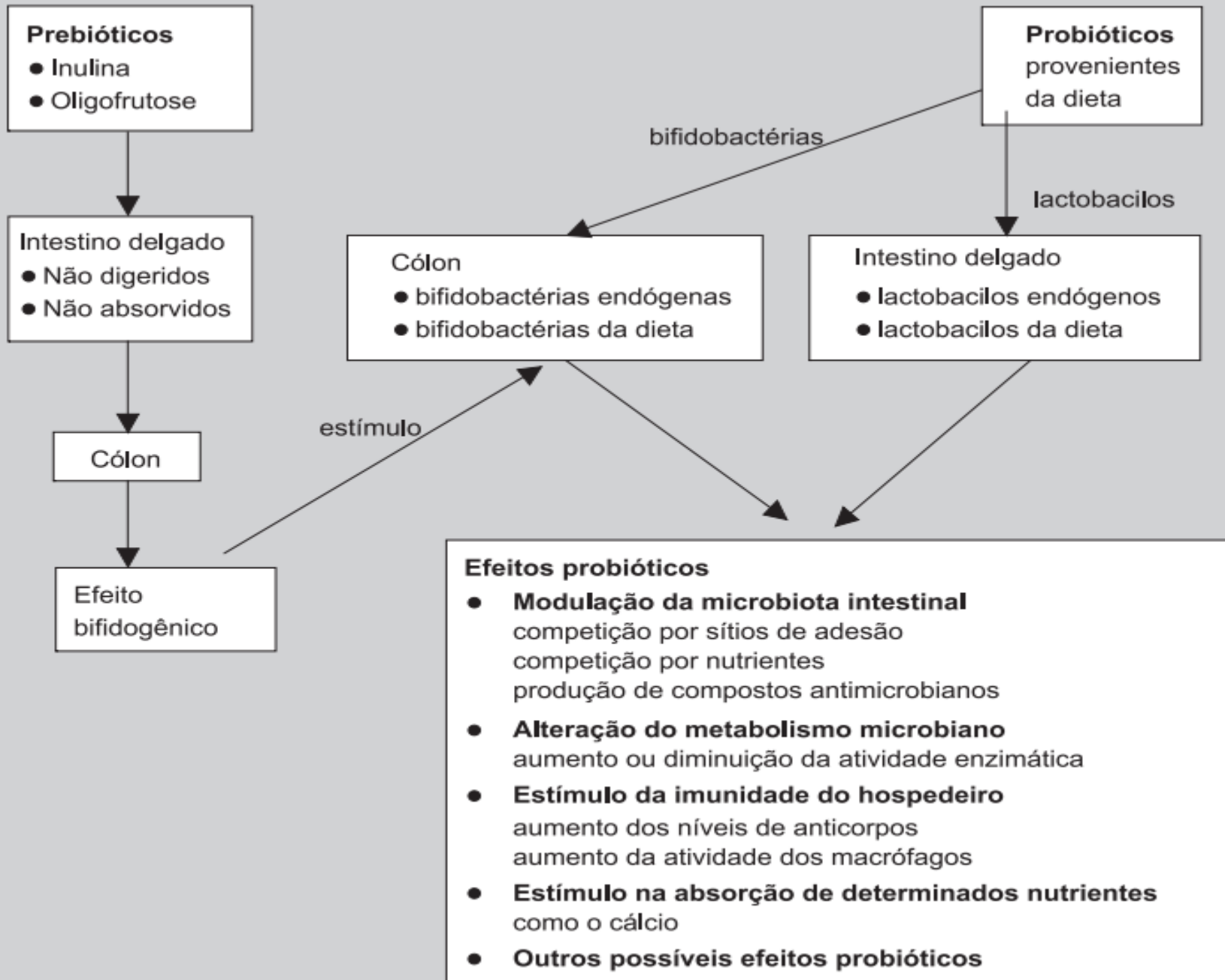
Alimentos “pró-bióticos” contêm bactérias vivas como suplemento alimentar, o que melhora o equilíbrio da microbiota intestinal, trazendo benefícios ao hospedeiro (Fuller 1989).

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



Prebióticos

- Inulina
- Oligofrutose

Intestino delgado

- Não digeridos
- Não absorvidos

Cólon

Efeito bifidogênico

Probióticos provenientes da dieta

bifidobactérias

lactobacilos

Cólon

- bifidobactérias endógenas
- bifidobactérias da dieta

Intestino delgado

- lactobacilos endógenos
- lactobacilos da dieta

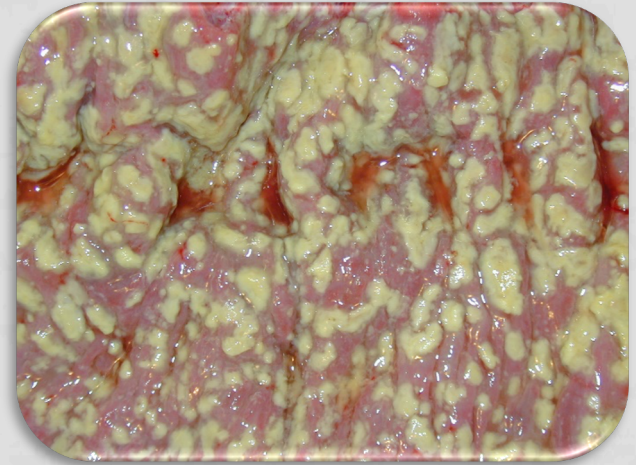
estímulo

Efeitos probióticos

- **Modulação da microbiota intestinal**
competição por sítios de adesão
competição por nutrientes
produção de compostos antimicrobianos
- **Alteração do metabolismo microbiano**
aumento ou diminuição da atividade enzimática
- **Estímulo da imunidade do hospedeiro**
aumento dos níveis de anticorpos
aumento da atividade dos macrófagos
- **Estímulo na absorção de determinados nutrientes**
como o cálcio
- **Outros possíveis efeitos probióticos**

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.



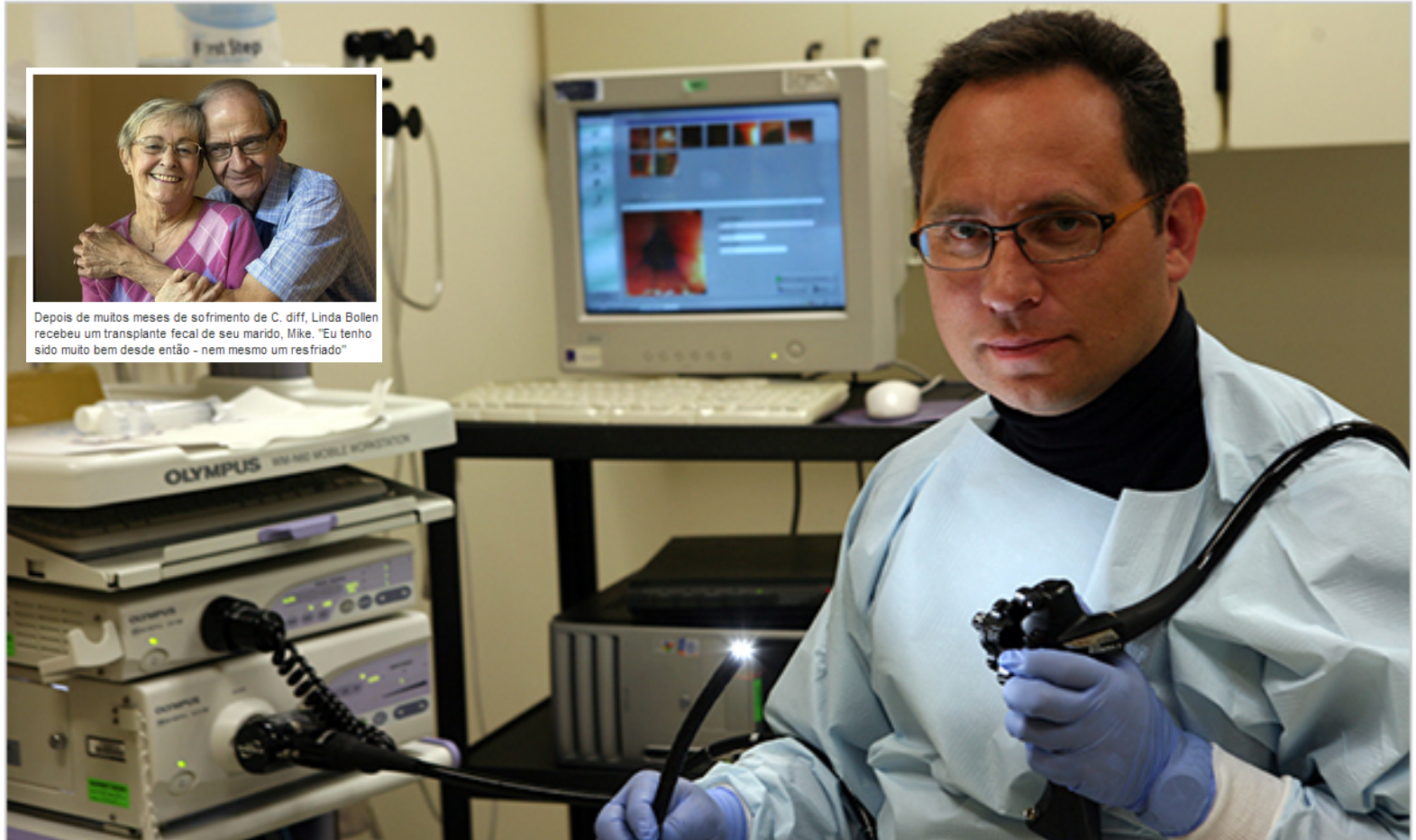
A substituição de componentes em falta (vitaminas, etc.) e a produção de produtos antimicrobianos pela “nova microbiota” tendem a ser os mecanismos de cura

*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.

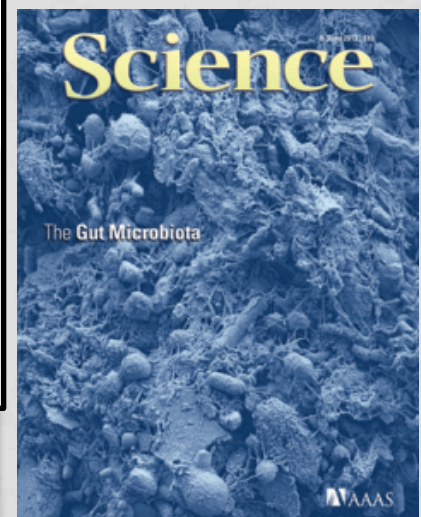
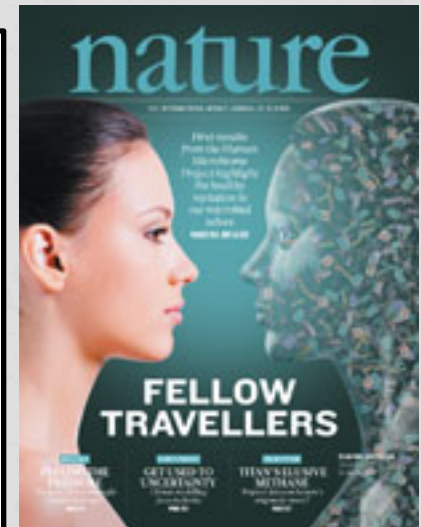
Projeto Microbioma Humano

"Indivíduo Saudável"

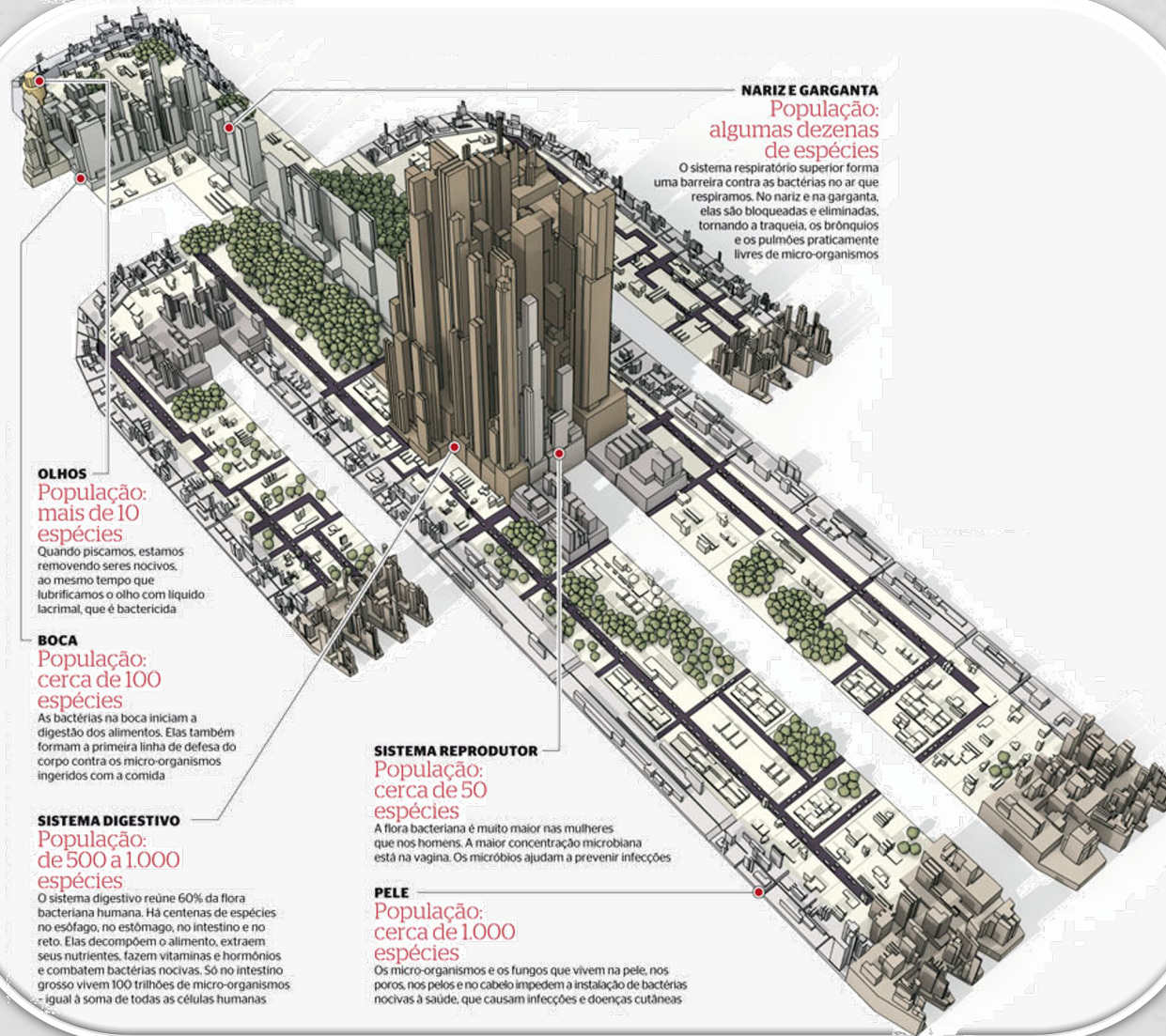
- 100 trilhões de microrganismos
- 10 vezes mais células procariontes
- 1-3% do peso corporal
- Mais de 10.000 espécies microbianas
- Genoma humano possui 22.000 genes
- Microbioma contribui cerca de 8 milhões de genes
- 360 vezes mais material genético

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

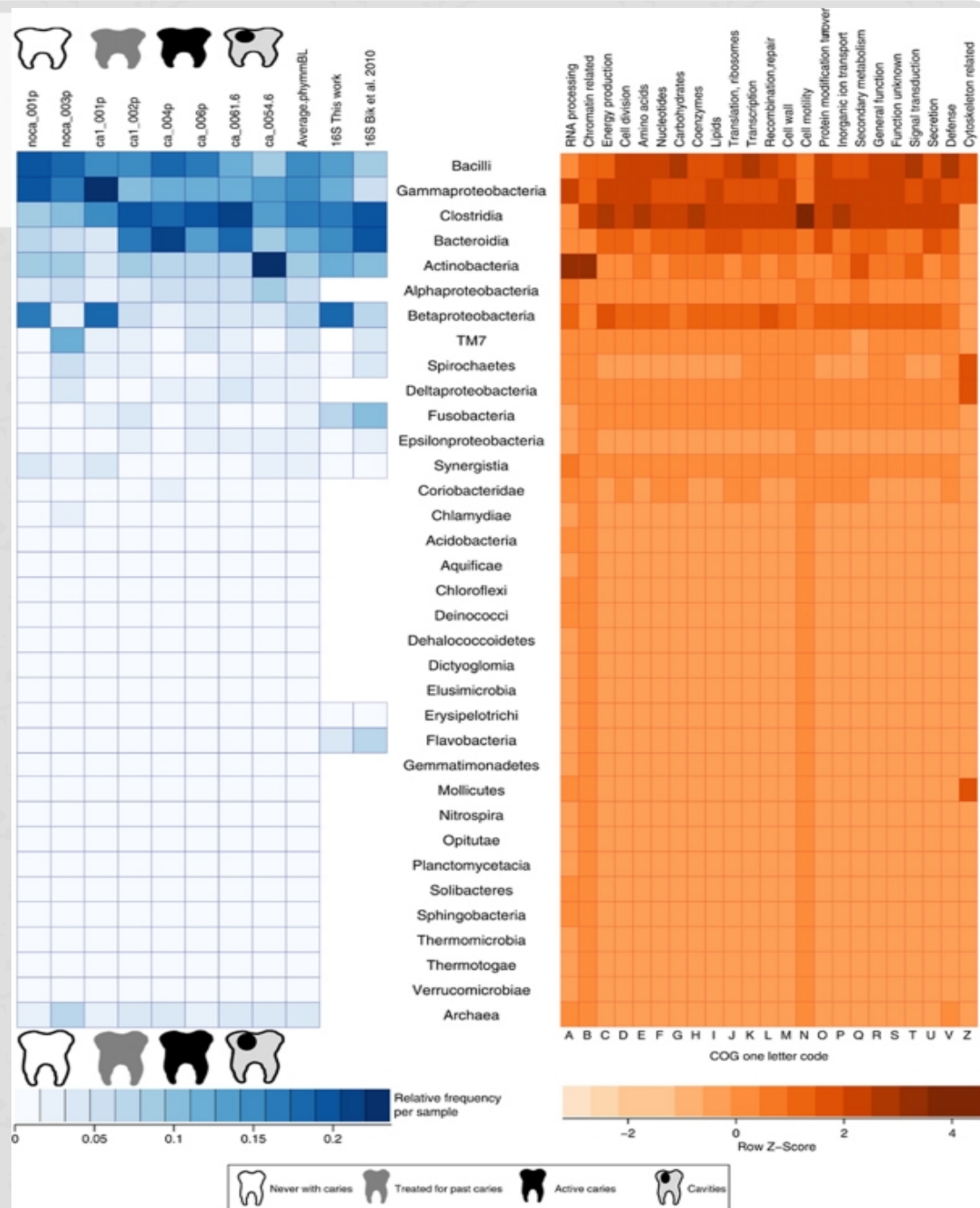
Diversidade de bactérias da cavidade oral (1Gbp sequenciados).

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

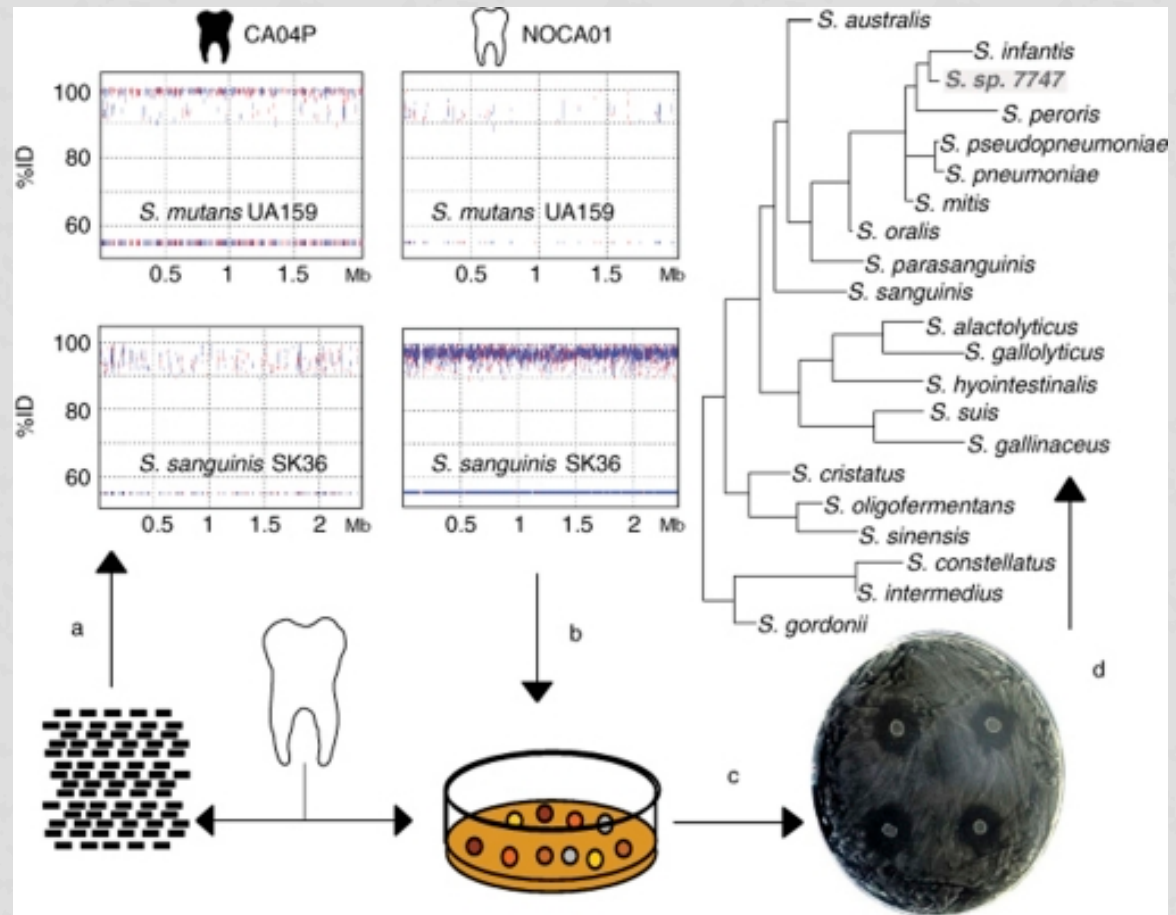
A análise revelou que indivíduos saudáveis possuem microbiota bucal com excesso de genes para **percepção da população** ("quorum sensing") e **peptídeos antimicrobianos**

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

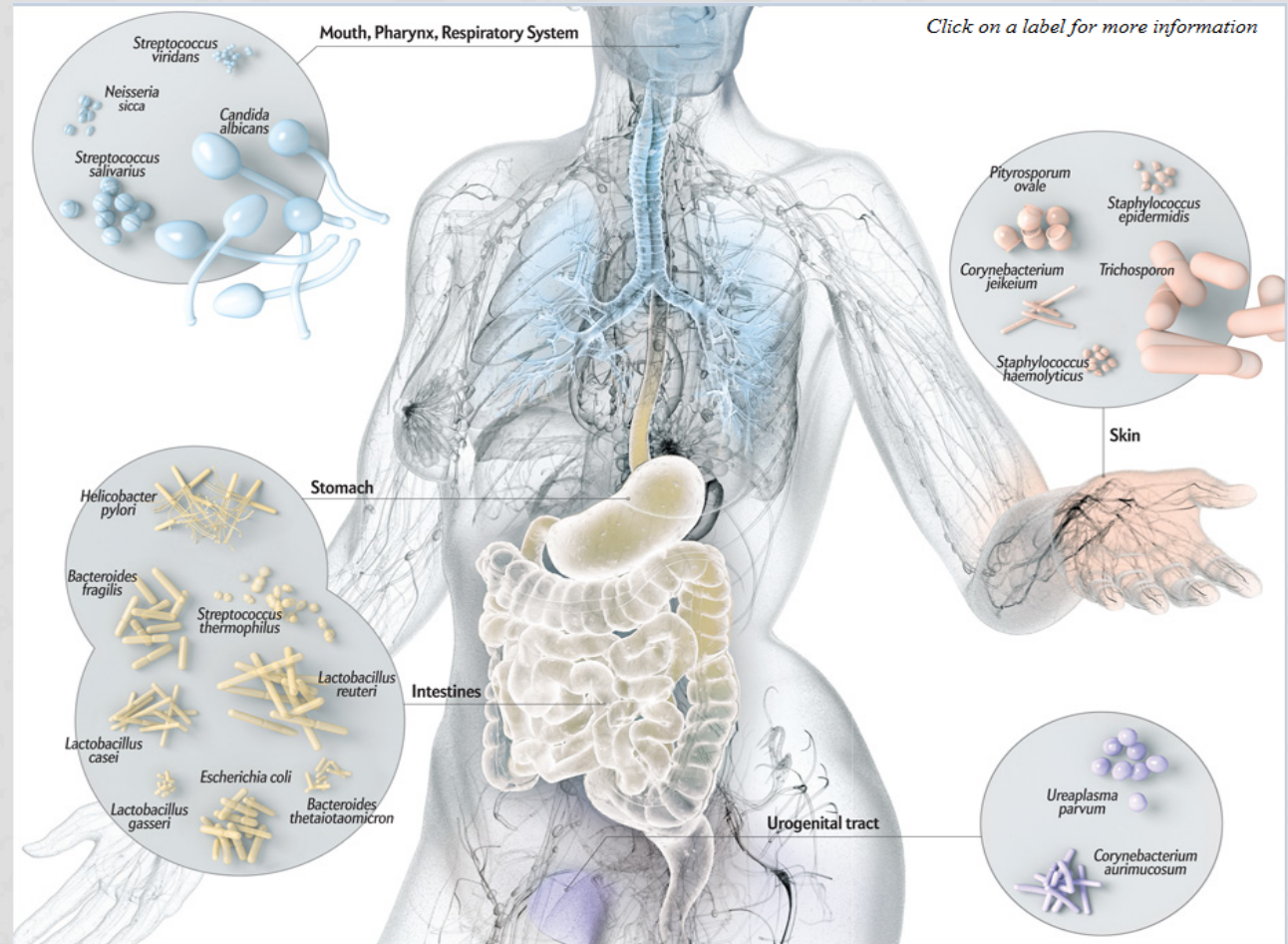


Belda-Ferre et al (2012) **The oral metagenome in health and disease**. ISME J. 2012 January; 6(1): 46–56. doi: 10.1038/ismej.2011.85

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 Parogênica 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);