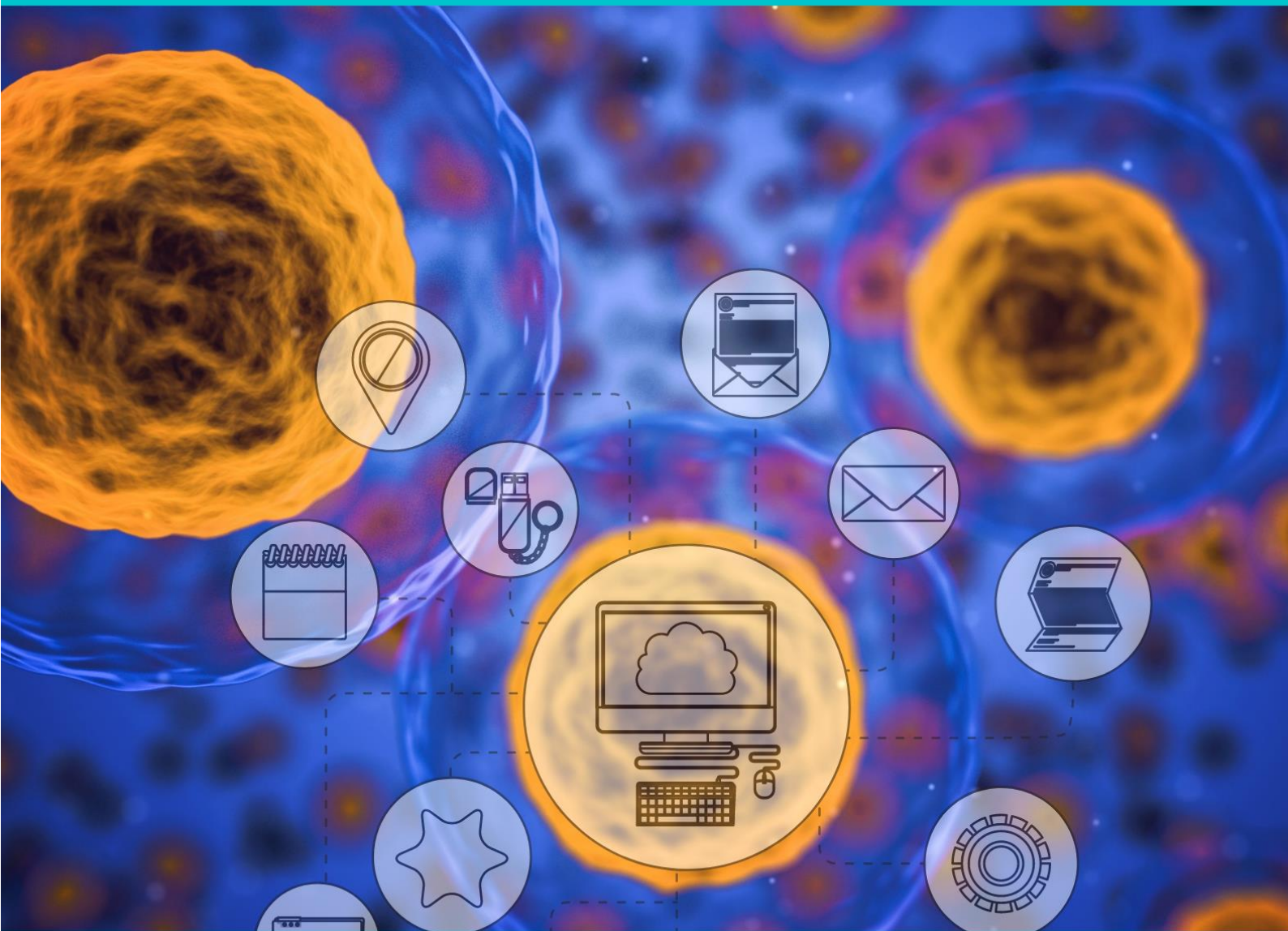


# ACHADOS DE BIOMATEMÁTICA E A BIOINFORMÁTICA NA SAÚDE HUMANA



Pantanal Editora

2021

**Diego Lisboa Rios**  
Organizador

**ACHADOS DE BIOMATEMÁTICA E A  
BIOINFORMÁTICA NA SAÚDE HUMANA**



Pantanal Editora

2021

Copyright® Pantanal Editora  
Copyright do Texto® 2021 Os Autores  
Copyright da Edição® 2021 Pantanal Editora  
Editor Chefe: Prof. Dr. Alan Mario Zuffo  
Editores Executivos: Prof. Dr. Jorge González Aguilera  
Prof. Dr. Bruno Rodrigues de Oliveira

Diagramação: A editora

Edição de Arte: A editora. Imagens de capa e contra-capas: Canva.com

Revisão: O(s) autor(es), organizador(es) e a editora

#### Conselho Editorial

- Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – OAB/PB
- Profa. Msc. Adriana Flávia Neu – Mun. Faxinal Soturno e Tupanciretã
- Profa. Dra. Albys Ferrer Dubois – UO (Cuba)
- Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – IF SUDESTE MG
- Profa. Msc. Aris Verdecia Peña – Facultad de Medicina (Cuba)
- Profa. Arisleidis Chapman Verdecia – ISCM (Cuba)
- Prof. Dr. Bruno Gomes de Araújo - UEA
- Prof. Dr. Caio Cesar Enside de Abreu – UNEMAT
- Prof. Dr. Carlos Nick – UFV
- Prof. Dr. Claudio Silveira Maia – AJES
- Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – UFGD
- Prof. Dr. Cristiano Pereira da Silva – UEMS
- Profa. Ma. Dayse Rodrigues dos Santos – IFPA
- Prof. Msc. David Chacon Alvarez – UNICENTRO
- Prof. Dr. Denis Silva Nogueira – IFMT
- Profa. Dra. Denise Silva Nogueira – UFMG
- Profa. Dra. Dennyura Oliveira Galvão – URCA
- Prof. Dr. Elias Rocha Gonçalves – ISEPAM-FAETEC
- Prof. Me. Ernane Rosa Martins – IFG
- Prof. Dr. Fábio Steiner – UEMS
- Prof. Dr. Gabriel Andres Tafur Gomez (Colômbia)
- Prof. Dr. Hebert Hernán Soto Gonzáles – UNAM (Peru)
- Prof. Dr. Hudson do Vale de Oliveira – IFRR
- Prof. Msc. Javier Revilla Armesto – UCG (México)
- Prof. Msc. João Camilo Sevilla – Mun. Rio de Janeiro
- Prof. Dr. José Luis Soto Gonzales – UNMSM (Peru)
- Prof. Dr. Julio Cezar Uzinski – UFMT
- Prof. Msc. Lucas R. Oliveira – Mun. de Chap. do Sul
- Prof. Dr. Leandris Argente-Martínez – Tec-NM (México)
- Profa. Msc. Lidiene Jaqueline de Souza Costa Marchesan – Consultório em Santa Maria
- Prof. Msc. Marcos Pisarski Júnior – UEG
- Prof. Dr. Mario Rodrigo Esparza Mantilla – UNAM (Peru)
- Profa. Msc. Mary Jose Almeida Pereira – SEDUC/PA
- Profa. Msc. Nila Luciana Vilhena Madureira – IFPA
- Profa. Dra. Patrícia Maurer
- Profa. Msc. Queila Pahim da Silva – IFB
- Prof. Dr. Rafael Chapman Auty – UO (Cuba)
- Prof. Dr. Rafael Felipe Ratke – UFMS
- Prof. Dr. Raphael Reis da Silva – UFPI

- Prof. Dr. Ricardo Alves de Araújo – UEMA
- Prof. Dr. Wéverson Lima Fonseca – UFPI
- Prof. Msc. Wesclen Vilar Nogueira – FURG
- Profa. Dra. Yilan Fung Boix – UO (Cuba)
- Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – UFT

#### Conselho Técnico Científico

- Esp. Joacir Mário Zuffo Júnior
- Esp. Maurício Amormino Júnior
- Esp. Tayronne de Almeida Rodrigues
- Esp. Camila Alves Pereira
- Lda. Rosalina Eufrausino Lustosa Zuffo

#### Ficha Catalográfica

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)</b> <b>(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
A175	Achados de biomatemática e a bioinformática na saúde humana / Organizador Diego Lisboa Rios. – Nova Xavantina, MT: Pantanal, 2021. 85p.
	Formato: PDF
	Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
	Modo de acesso: World Wide Web
	ISBN 978-65-88319-54-3
	DOI <a href="https://doi.org/10.46420/9786588319543">https://doi.org/10.46420/9786588319543</a>
	1. Matemática. 2. Informação. 3. Tecnologia. I. Rios, Diego Lisboa. II. Título.
	CDD 510
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

O conteúdo dos e-books e capítulos, seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva do(s) autor (es) e não representam necessariamente a opinião da Pantanal Editora. Os e-books e/ou capítulos foram previamente submetidos à avaliação pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação. O download e o compartilhamento das obras são permitidos desde que sejam citadas devidamente, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais, exceto se houver autorização por escrito dos autores de cada capítulo ou e-book com a anuência dos editores da Pantanal Editora.



#### **Pantanal Editora**

Rua Abaete, 83, Sala B, Centro. CEP: 78690-000. Nova Xavantina – Mato Grosso – Brasil.  
 Telefone (66) 99682-4165 (Whatsapp).  
<https://www.editorapantanal.com.br>  
[contato@editorapantanal.com.br](mailto:contato@editorapantanal.com.br)

## APRESENTAÇÃO

Na era da informação, os avanços tecnológicos ditaram uma nova ordem mundial, determinando novos princípios, alterando antigos conceitos e criando novas áreas do conhecimento humano. Diante disto, as ciências existentes tiveram que se apropriar aos princípios tecnológicos, informatizando-se para poder acompanhar o avanço que a computação propiciou, surgindo a Bioinformática. A palavra “Bioinformática” foi cunhada inicialmente por Pauline Hogeweg em 1979 para estudos de processos de informática em estudos de biologia sistematica. Há na literatura distintas interpretações sobre a definição de Bioinformática. Na sua definição ampla, a Bioinformática envolve a aplicação de Tecnologias de Informação e de Comunicação (TIC) nas análises de qualquer área da Biologia. De maneira mais restrita, a Bioinformática é a aplicação de informática aos experimentos de Biologia Molecular, ou mais especificamente no manejo da grande quantidade de dados gerados no sequenciamento de DNA, RNA e Genômica, em especial para auxiliar aminoácidos.

Com o desenvolvimento da Bioinformática, suas novas descobertas e os problemas epistemológicos, surge a necessidade de se elaborar modelos matemáticos que possam assumir hipóteses com relação ao fenômeno estudado. São vários os modelos identificados nos problemas computacionais e biológicos, o modelo de Malthus e Verhulst, elaborados para descrever o crescimento de uma população sendo que cada um tem suas próprias limitações em considerar o meio analisado, ambos fazem aproximações na descrição dos fenômenos observados, não chega a ser um fator exato, visto que a biologia é uma ciência que possui componentes complexos.

São vários os processos biológicos que inspiram novos métodos, teorias e técnicas matemáticas. Por exemplo, os algoritmos genéticos que se inspiram nos processos biológicos de seleção, mutação e recombinação, máximos e mínimos de funções de muitas variáveis como as redes neurais que permitem imitar o funcionamento das redes de neurônios. Essa união entre a matemática e as ciências biológicas tem ajudado a desenvolver suas próprias áreas, os sistemas dinâmicos em tempo discreto e em tempo contínuo, probabilidade, estatística e processos estocásticos, equações diferenciais ordinárias e as derivadas parciais, álgebra linear e teoria de grupos são mais exemplos de conteúdos de matemática que foram ganhando espaço através de problemas biológicos.

Uma das grandes dificuldades para o uso da Matemática pelos biólogos, e em menor medida pelos bioinformáticos, é a falta de compreensão entre os praticantes dos dois campos, com frequência, vemos muitos biólogos sem nenhum conhecimento matemático e matemáticos que não têm a mínima ideia do que seja Biologia, fazendo com que a colaboração e interação entre essas duas disciplinas se torne cada vez mais difícil. Profissionais capazes de fazer a ponte entre as duas áreas são raros e altamente valorizados, além da falta de capacitação de ambos, pois é incomum visualizarmos a oferta de disciplina para interação dessas duas áreas nos cursos de formação. Desse modo percebemos que não é comum ver biólogos

utilizando números e fazendo cálculos, nem matemáticos que passam horas admirando a natureza, a distância entre esses dois tipos de disciplinas até existem, mas estão longe de ser distintas, um número cada vez maior de perguntas do mundo biológico está encontrando respostas no universo matemático, fazendo com que a disciplina de Matemática, que era conhecida como um bicho-de-sete-cabeças, pudesse se reinventar e combinar com muitas outras disciplinas, de modo que com essa interdisciplinaridade possa facilitar a aprendizagem de conteúdos matemáticos e biológicos entre outras áreas da educação.

Também se defende que Bioinformática aplica os princípios da Ciência da Informação para interpretar dados biológicos, enquanto a Biologia Computacional aplica os algoritmos matemáticos e computacionais aos experimentos biológicos. Os recursos fundamentais da bioinformática são os programas de computadores e os bancos de dados disponíveis na internet, ação fundamental para a análise de sequências de DNA e proteínas. Esta ferramenta é capaz de promover o aumento da velocidade na análise de sequências de DNAs de diferentes fontes, na comparação de variabilidades e na previsão de resultados de análises.

A bioinformática está sendo utilizada em diversas áreas como, a construção de banco de dados e a mineração de dados com o propósito de tratar esses dados biológicos brutos. A bioinformática se estabeleceu como uma nova área do conhecimento, graças a progressiva necessidade de desenvolver programas computacionais que permitam identificar sequências de genes, prever a configuração tridimensional de proteínas, distinguir inibidores de enzimas, organizar e relacionar informação biológica, classificar proteínas homólogas, determinar árvores filogenéticas, analisar experimentos de expressão gênica, design de drogas entre outras.

Anteriormente ao surgimento da bioinformática, o sequenciamento de DNA era realizado manualmente, demandando dos sequenciadores muito tempo de trabalho. Além disso, com o tempo, houve um aumento na quantidade de dados, surgindo assim, a necessidade de manter esses dados acessíveis e organizados. Nessa circunstância, a bioinformática foi desenvolvida para atender, num curto espaço de tempo, essa necessidade.

O presente trabalho teve como objetivo contextualizar o uso de algoritmos matemáticos pela bioinformática, explicitando seus conceitos e avanços nas pesquisas dos autores envolvidos, abordando também a importância destes para a saúde.

## SUMÁRIO


<b>Apresentação .....</b>	<b>4</b>
<b>Capítulo I.....</b>	<b>7</b>
O uso de softwares com algoritmos matemáticos em análises de metatranscriptoma: o exponencial impacto do <i>big data</i> na saúde humana	7
<b>Capítulo II .....</b>	<b>20</b>
Probióticos: mineração de dados evidencia como uma microbiota intestinal saudável ajuda a combater infecções respiratórias virais agudas, similares à Covid-19	20
<b>Capítulo III.....</b>	<b>37</b>
Remdesivir: mineração de dados e bioinformática sugerem ação no controle do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-Cov-2)	37
<b>Capítulo IV .....</b>	<b>51</b>
O metatranscriptoma em alimentos: o impacto estatístico da expressão gênica do microbioma na saúde humana	51
<b>Capítulo V .....</b>	<b>64</b>
Bioinformática e kefir: quais os benefícios na saúde humana do probiótico mais antigo já descoberto?	64
<b>Índice Remissivo .....</b>	<b>84</b>
<b>Sobre o Organizador .....</b>	<b>85</b>

# O uso de softwares com algoritmos matemáticos em análises de metatranscriptoma: o exponencial impacto do *big data* na saúde humana

 10.46420/9786588319543cap1


Diego Lisboa Rios<sup>1\*</sup> 


Silvia de Siqueira Costa<sup>2</sup> 

Thiago Araújo Andrade<sup>3</sup> 

Paula Margarita Salazar Torres<sup>4</sup> 

Lucas Roberto da Silva<sup>5</sup> 

Pedro Gontijo Carneiro<sup>6</sup> 

Kerley dos Santos Alves<sup>7</sup> 

Wellington Ribeiro Aquino Marques<sup>8</sup> 

João Batista Matos Júnior<sup>9</sup> 

Fabyola Antunes Gonçalves Souza<sup>10</sup> 

## INTRODUÇÃO

Para além do corpo humano, comunidades de microrganismos são encontradas em diversos outros ambientes, como oceano, solo, plantas e outros animais (Li et al., 2017). Cada uma dessas comunidades microbianas tem suas próprias complexidades, diversidades e ecossistemas. Os membros das comunidades interagem entre si e cooperam com seus ambientes ou hospedeiros. Recentemente, com o desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento que permitem aos pesquisadores estudar genomas da microbiota (também conhecido como microbioma), se descobriu que a microbiota humana está intimamente relacionada a várias doenças. Uma das áreas mais críticas é a pesquisa do microbioma humano associada a doenças humanas bem conhecidas, como obesidade, doença inflamatória intestinal (DII) e gêmeos magros ou obesos (Chen et al., 2018). Além disso, evidências crescentes indicam que a microbiota

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>2</sup> Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Divinópolis - MG.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>4</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>5</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>6</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>7</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>8</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>9</sup> Instituto Federal do Acre (IFAC), Rio Branco - AC.

<sup>10</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

\* Autor(a) correspondente: lisboa.zootec@gmail.com



dentro do corpo humano, especialmente o microbioma intestinal, desempenha um papel fundamental na fisiologia humana (Liu et al., 2016).

Atualmente, vários métodos são aplicados para inferir diferentes níveis de informação sobre o microbioma. A análise *Whole genome sequencing* (WGS) usa informações de todos os genes para identificar taxonomicamente a comunidade microbiana em nível de espécie ou linhagem. Já a análise *shotgun* do transcriptoma completo da amostra, chamado de metatranscriptoma, permite a observação de padrões na expressão gênica e funcional de toda a comunidades microbiana. No entanto, apesar das diversas vantagens em se utilizar esse método, algumas desvantagens são observadas, sendo esta muito carente de *softwares* específicos para análise dos dados (Bushmanova et al., 2019).

Na busca por padrão e banco de dados mais curado, vários estudos de microbioma com base populacional foram criados. O *Human Microbiome Project*, foca no estudo de comunidades microbianas que habitam o corpo humano de indivíduos saudáveis, com ênfase nas áreas nasal, oral, cutânea, gastrointestinal e urogenital. Já o *Interactive Human Microbiome Project* se concentra na compreensão das interações humano-microbioma, por meio de estudos longitudinais que reúnem múltiplos conjuntos de dados ômicos do microbioma humano (Nurk et al., 2017). Além disso, outro projeto chamado Metagenômica do Trato Intestinal Humano (MetaHIT) se baseia na compreensão da relação entre a microbiota intestinal humana e a os benefícios à saúde (Ugarte et al., 2018). Não obstante, o MetaHIT também estuda obesidade e DII. Por fim, o *Earth Microbiome Project* (EMP) se concentra na caracterização da diversidade, distribuição e estrutura dos ecossistemas microbianos em todo o planeta e já reuniu mais de 30.000 amostras de diversos ecossistemas, incluindo humanos, animais, plantas terrestres, marinhas, ambientes reconstruídos e entre outros (Bushmanova et al., 2019). EMP é um dos projetos pioneiros de microbioma a definir alguns protocolos padrão para outros estudos de microbioma.

Com as limitações crescentes na compreensão dos mecanismos de um microbioma individual, e em escala global, além das dificuldades associadas à cultura de espécies microbianas individuais, a metatranscriptômica têm sido usada com mais frequência em estudos recentes (Tarazona et al., 2015). Reconhecendo a importância dos estudos de microbioma para a saúde humana e além, nos esforçamos para fornecer uma revisão abrangente das tecnologias, algoritmos e *softwares* na análise metatranscriptômica existentes, especificamente os métodos de análise de dados. Esperamos que as informações fornecidas ajudem mais pesquisadores a identificar as ferramentas apropriadas para seus estudos de microbioma em seus respectivos projetos.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Análise bioinformática de dados de sequenciamento metatranscriptômico*

Em virtude da complexidade do microbioma, o sequenciamento de alto rendimento na forma de *reads* relativamente curtas geralmente são geradas a partir da tecnologia de sequenciamento Illumina. Tem sido mais frequentemente aplicado para estudos de metatranscriptoma, particularmente quando são necessárias várias amostras e cobertura profunda, como nos casos de estudos de expressão gênica diferencial. Uma vez que, *a priori*, a maioria das informações sobre as amostras são desconhecidas, assim como sua composição microbiana, abundância relativa de membros da comunidade, tamanhos do genoma e expressão relativa dentro e entre os genomas, não é trivial encontrar parâmetros experimentais corretos, como profundidade de sequenciamento para metatranscriptômica. Embora o sequenciamento de *reads* mais longas possa produzir mRNAs completos ou quase completos que podem ajudar a discriminar entre diferentes isoformas (Celaj et al., 2014), e fornecer trechos mais longos de sequência para pesquisas de similaridade e às várias tecnologias de leitura longa atualmente apenas desempenham um papel de apoio que não estão sendo ativamente usadas sozinhas para estudos de metatranscriptoma. Nessa revisão, nos concentramos nas ferramentas e fluxos de trabalho disponíveis para processamento e análise de dados de metatranscriptoma, que se concentram em dados de *reads* curtas.

### *Pré-Processamento*

Semelhante a outros conjuntos de dados NGS, uma das primeiras etapas no processamento de dados de RNASeq é executar o Controle de Qualidade (QC) e remover ou aparar leituras falsas ou errôneas. São várias as ferramentas para fazer o QC das *reads* de RNASeq (Tabela 1).

**Tabela 1.** Softwares de pré-processamento e de análise da qualidade dos dados.

Software	Função	Autor
FastQC	Entre as mais utilizadas atualmente, usadas para <i>reads</i> curtas derivadas de sequenciadores Illumina.	(Andrews, 2010)
FaQCs	Entre as mais utilizadas atualmente, usadas para <i>reads</i> curtas derivadas de sequenciadores Illumina.	(Lo et al., 2014)
Fastp	Entre as mais utilizadas atualmente, usadas para <i>reads</i> curtas derivadas de sequenciadores Illumina.	(Chen et al., 2018)
Trimmomatic	A mais utilizada atualmente, usadas para <i>reads</i> curtas derivadas de sequenciadores Illumina.	(Bolger et al., 2014)

SortMeRNA	Remoção de rRNAs.	(Kopylova et al., 2012)*
Barrnap	Remoção de rRNAs.	(Seemann, 2014) *
BMTagger	Pesquisam <i>kmers</i> humanos específicos nas <i>reads</i> .	(Rotmistrovsky et al., 2011)
-	<i>Reads</i> podem ser removidas usando métodos tradicionais de mapeamento que marcam e removem <i>reads</i> que mapeadas no genoma humano.	(Li et al., 2017)

\* Uma das etapas mais importantes que devem ser levadas em consideração é a remoção ou depleção física dos transcritos de RNA ribossômico altamente abundante (rRNA) das amostras, pois eles geralmente representam mais de 90% de todos os dados gerados no sequenciamento, geralmente removidos usando técnicas moleculares antes do sequenciamento, mas sua abundância nas amostras resulta em uma certa quantidade de contaminação por nas *reads*.

### A montagem de novo

As leituras pré-processadas e de alta qualidade agora podem ser montadas em transcrições putativas, *contigs*, usando montadores *de novo*. Dado que a maioria dos microbiomas não é adequado para o alinhamento caracterizado pelos genomas de referência, os montadores *de novo* fornecem uma solução de para a referência, representando segmentos de genoma mais longos e expressos que podem fornecer um conjunto de genes de referência. Isso fornece aos pesquisadores a capacidade de encontrar homólogos de maneira mais direta, estabelecer origem taxonômica e servir como referência para mapeamento e análise de expressão (Quadro 1).

**Quadro 1.** Montadores *de novo* atuais.

Software	Função	Autor
MEGAHIT	Montadores metagenômicos projetados para lidar com metagenomas complexos que podem compartilhar alguma semelhança de sequência em regiões altamente conservadas, mas podem variar em termos de abundância relativa dentro do microbioma e também podem abrigar variação populacional (nível de deformação).	(Li et al., 2015)*
IDBA-UD		(Peng et al., 2012)*
metaSPAdes		(Nurk et al., 2017)*
Trans-ABYSS	Montadores que tentaram resolver os problemas na análise de metatranscriptomas, mas foram originalmente projetados para montar transcriptoma de um único organismo.	(Robertson et al., 2010)**
Trinity		(Grabherr et al., 2011)**
BinPacker		(Liu et al., 2016)**

Oásis		(Schulz et al., 2012)**
SOAPdenovo-Trans		(Xie et al., 2014)**
IDBA-Tran		(Peng et al., 2012)**
rnaSPAdes		(Bushmanova et al., 2019)**
IDBA-MT	Montadores <i>de novo</i> projetados especificamente para metatranscriptomas que levam em conta as características únicas dos transcritos e a natureza complexa das comunidades microbianas.	(Leung et al., 2013)***
IDBA-MTP		(Leung et al., 2014)****
Transcript Assembly Graph (TAG)		(Ye et al., 2016)*****

\* No entanto, a eficácia desses montadores na reconstrução de transcritos que possuem peculiaridades próprias, como íntrons e éxons, diferentes isoformas e RNAs não codificadores mais curtos (ncRNA), raramente são testados; portanto, é recomendável que se use montadores específicos para dados metagenômica em conjuntos de dados de metatranscriptoma.

\*\* Tentaram explicar os problemas no sequenciamento de transcriptomas, mas foram originalmente projetados para montar transcrições de um único organismo. Apesar de seu design para conjuntos de dados transcriptômicos e não metatranscriptômicos, as comparações entre alguns montadores mostraram que, em geral, os montadores testados Oases, Trinity e Metavelvet melhoraram o número de genes anotados nos contigs resultantes, com o montador Trinity superando os demais (Celaj et al., 2014).

\*\*\* Baseado no IDBA-UD, usa-se múltiplos valores em um gráfico *de Bruijn*, enquanto considera-se os recursos associados aos mRNAs, como profundidade de sequência desigual e padrões comuns de repetição em diferentes mRNAs, diminuindo assim a taxa de erros de montagem (Leung et al., 2013).

\*\*\*\* Derivado do IDBA-MT para poder montar mRNAs de baixa expressão. Ele usa as informações de sequências de proteínas conhecidas para orientar a montagem, começando com *k-mers* menores para construir sequências de mRNA que são então incluídas com base na sua similaridade (Leung et al., 2014).

\*\*\*\*\* Montador que, comparativamente, também usa um gráfico *de Bruijn*, mas para montar o metagenoma correspondente, que é usado como referência para posteriormente mapear as leituras do metatranscriptoma e reconstruir sequências de mRNA. É ineficaz para uso em microbiomas que, além de bactéria, também englobam alguns fungos. Além disso, existe a suposição implícita entre o metagenoma da comunidade para que todos os genes expressos possam ser mapeados (Ye et al., 2016).

O estado atual da montagem *de novo* para conjuntos de dados metatranscriptômicos ainda está em estágios iniciais. Apenas algumas ferramentas foram desenvolvidas especificamente para a metatranscriptômica, mas sua eficácia em diversos conjuntos de dados não foi testada e seu hardware ou requisitos de memória em uma variedade de complexidades da comunidade e volume de dados também não foram rigorosamente estabelecidos.

### ***Taxonomia dos transcritos***

Semelhante ao perfil taxonômico, que é frequentemente realizado com dados metagenômicos de *shotgun*, pode-se usar o mesmo conjunto de ferramentas para realizar atribuições taxonômicas baseadas em *reads* ou *contigs*, a fim de entender quais os organismos estão expressando ativamente em determinada amostra. Um método separado e distinto é focar apenas nos rRNAs para avaliar membros ativos de uma comunidade, embora, como mencionado acima, eles sejam frequentemente removidos (tanto nos protocolos de laboratório quanto no pré-processamento dos dados brutos).

Ferramentas de classificação de taxonomia baseadas em *reads*, como Kraken (Wood e Salzberg, 2014), GOTCHA (Freitas et al., 2015), MetaPhlan2 (Truong et al., 2015) etc. podem ser usadas para metatranscriptomas (Neves et al., 2017). Como essas ferramentas funcionam em sequências curtas e se baseiam em combinações de nucleotídeos, seu uso efetivo é limitado a microrganismos, mas cujos os membros possuam vizinhos próximos às sequência existentes nos bancos de dados que foram montadas em *contigs* mais longos e possivelmente transcritos completos podem ser usados por várias ferramentas, como Centrifuge (Kim et al., 2016) e Kraken 2 (Wood et al., 2014), para identificar potencialmente uma maior proporção dos membros da comunidade sequenciados.

As atribuições taxonômicas que utilizam *reads* ou regiões de codificação previstas têm um grande número de limitações, incluindo os algoritmos necessários para processar grandes volumes de dados ou acomodar sequências curtas e a escassez de citações nos bancos de dados de referência. Para compor essas questões, está o fato de que a maioria das ferramentas de bioinformática utilizam-se de apenas um subconjunto de genomas disponíveis ou se concentra em certos organismos. Por exemplo, muitas ferramentas não possuem eucariotos como parte de seus bancos de dados. Houveram alguns esforços recentes, como o desenvolvimento de novas ferramentas e melhorias nas ferramentas existentes para incluir genomas eucarióticos em seus bancos de dados, como MetaPhlan2 e Kaiju (Truong et al., 2015), porém sua eficácia na classificação de eucariotos é desconhecida. Além disso, muitas vezes é difícil discernir acerca de baixa abundância de acertos falsos positivos, o que é um problema inato nos estudos de microbioma. A falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana geral ou em qualquer sistema biológico também pode limitar a utilização das ferramentas de classificação da taxonomia.

### ***Anotação funcional***

Um dos principais objetivos da metatranscriptômica é avaliar a atividade funcional de uma comunidade microbiana. Como os transcritos expressos representam um *proxy* para o fenótipo real, caracterizar a função dos transcritos é uma tarefa fundamental para a metatranscriptômica. A anotação funcional pode ser realizada usando *reads* ou *contigs* montados.

Os perfis funcionais baseados em *reads*, como MetaCLADE (Ugarte et al., 2018), HMM-GRASP<sub>x</sub> (Zhong et al., 2016) e UProC (Meinicke, 2015) utilizam bancos de dados específicos e exigem frames de leitura abertos previstos como entrada de outras ferramentas, como FragGeneScan (Rho et al., 2010). O MetaCLADE é uma das ferramentas mais recentes e usa um banco de dados que consiste em 2 milhões de modelos probabilísticos derivados de 15.000 domínios da Pfam, portanto centenas de modelos representando um único domínio, para abranger a diversidade de cada domínio na árvore da vida. Uma pesquisa nesse banco de dados resulta em um grande número de ocorrências por leitura que são filtradas com base em redundância, probabilidade e pontuação de *bits* (Ugarte et al., 2018).

De maneira alternativa, a anotação de genes pode ser realizada a partir de *contigs* montados. A anotação de transcritos montados é semelhante às anotações de genomas e metagenomas. A descoberta de genes usando programas como Prodigal (Hyatt et al., 2010) e FragGeneScan (Rho et al., 2010) é seguida por atribuição funcional com base em pesquisas de similaridade usando ferramentas como DIAMOND para pesquisar sua funcionalidade em bancos de dados, como KEGG, NCBI RefSeq, UniProt, entre outros (Buchfink et al., 2015). Outras ferramentas, pipelines e plataformas abrangem uma variedade de utilitários de bioinformática (incluindo busca e anotação de genes), como o Prokka (Seemann, 2014), EDGE Bioinformatics (Li et al., 2017) e MG-RAST (Wilke et al., 2016) que combinam várias pesquisas de similaridade em vários bancos de dados ou podem até unir a montagem, identificação de genes e anotação por meio de pesquisas de similaridade. Depois que as anotações são executadas, as funções enzimáticas também podem ser mapeadas para as vias metabólicas conhecidas, usando ferramentas como MinPath (Ye et al., 2009) ou iPath (Yamada et al., 2011).

### ***Análise de expressão diferencial***

Além da descrição simples de quem são os membros ativos e quais genes estão sendo expressos em um único momento ou amostra, estão os estudos de expressão diferencial de genes, nos quais a metatranscriptômica pode ser usada para comparar diferentes condições, parâmetros ambientais e seus efeitos na comunidade. Existem muitas ferramentas originalmente desenvolvidas para uso de genomas únicos que possam ser aproveitadas para estudos de expressão gênica diferencial metatranscriptômica. Essas ferramentas requerem como dados a abundância de entrada por gene (ou transcrito) e por amostra (representando a expressão sob uma condição específica ou um momento específico). A abundância pode ser obtida de várias maneiras, mas geralmente envolvem algumas formas de alinhamentos/mapeamentos das *reads* para um genoma de referência, um conjunto de referência ou um conjunto de genes de referência.

Os programas EdgeR (Robinson et al., 2010), DeSeq2 (Love et al., 2014) e LIMMA (Ritchie et al., 2015) são pacotes do R que são frequentemente usados, juntamente com as informações de abundância, para identificar genes que são estatisticamente diferencialmente expressos entre várias amostras. Da

mesma forma, ferramentas como Análise do Conjunto de Genes (GAGE) podem ser usadas para identificar caminhos enriquecidos em uma condição sobre outra (Li et al., 2017). Como as amostras de metatranscriptômica replicadas não são triviais comparadas aos estudos transcriptômicos com organismos isolados, métodos não paramétricos como a implementação no NOISeq (Tarazona et al., 2015) também devem ser considerados.

Existem peculiaridades nas análises metatranscriptômicas que tornam as análises de expressão diferencial bastante desafiadoras, principalmente o resultado do sequenciamento de uma grande diversidade de transcritos (de uma ampla variedade de organismos). Problemas como genes compartilhados entre organismos intimamente relacionados e variação na composição taxonômica dos transcritos podem resultar em avaliação incorreta dos perfis de expressão gênica. Recentemente, foi proposto um método de normalização que pode minimizar a influência da diversidade taxonômica na amostra, normalizando os dados de contagem com base na composição taxonômica em diferentes amostras, porém esse método também é influenciado pela representação em bancos de dados taxonômicos (Klingenberg et al., 2017).

### ***Pipelines – Fluxos de trabalho disponíveis para análise metatranscriptômica***

A análise de um conjunto de dados de metatranscriptoma está repleta de etapas bioinformáticas com muitas opções de ferramentas para qualquer etapa. Quais etapas e ferramentas devem ser selecionadas são frequentemente escolhidas pelos objetivos do experimento, cujos os detalhes podem crescer em complexidade com base nas especificidades do estudo. No entanto, existem fluxos de trabalho em bioinformática, chamados de *pipelines* ou *workflow*, que visam otimizar parte dessa complexidade conectando várias ferramentas individuais que transformam *reads* brutas de sequenciamento e as processam, fornecendo arquivos de dados que representam os resultados das saídas, caracterizando identidades taxonômicas, genes funcionais e transcritos diferencialmente expressos. Os detalhes de oito fluxos de trabalho disponíveis, seus recursos e as ferramentas específicas de bioinformática que eles usam podem ser encontrados como um resumo na Tabela 2.

**Tabela 2.** *Pipelines* de metatranscriptômica e seus recursos.

		Baseado em <i>Reads</i>					Baseado em montagem		
		MetaTrans	COMAN	FMAP	SAMSA2	HUMAnN2	SqueezeMeta	IMP	MOSCA
Processamento	QC	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓
	Remoção das reads do hospedeiro	×	×	✓	×	×	×	✓	×
	Remove rRNA	✓	✓	×	✓	×	✓	✓	✓
Montagem <i>de novo</i>		×	×	×	×	×	✓	✓	✓
<i>Binning</i>		×	×	×	×	×	✓	✓	×
Perfil Taxonômico	<i>Reads</i>	✓	✓	×	✓	✓	×	×	×
	<i>Contigs</i>	×	×	×	×	×	✓	✓	✓
Anotação Funcional	<i>Reads</i>	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	×
	<i>Contigs</i>	×	×	×	×	×	✓	✓	✓
Análise <i>Pathway</i>		✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	×
Precisa de Metagenoma		×	×	×	×	×	×	✓	×
Reporta resumos		×	×	×	×	×	×	✓	×
Interface <i>Web</i>		×	✓	×	×	×	×	×	×
Comparação de múltiplas amostras		✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓



Expressão Diferencial	✓	✓	✓	✓	×	×	×	✓
Docker	×	×	×	×	✓	×	✓	✓
Conda	×	×	×	×	✓	×	✓	×
Suporta <i>reads</i> longas	×	×	×	×	×	✓	×	×
Repositório de código público.	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Em comparação às análises baseadas em leitura, os fluxos de trabalho baseados em montagem abrigam uma etapa analítica extra. As análises são reunidas primeiramente em *contigs* maiores, ajudando a reduzir o tamanho dos dados que precisam ser processados para análises posteriores e aumentando a quantidade contínua do comprimento das transcrições expressas.

Como um dos principais objetivos das análises de metatranscriptoma é obter uma quantificação relativa da expressão gênica, todos os fluxos de trabalho baseados em leitura e em montagem fornecem alguma forma de cobertura por gene ou métrica de abundância (por exemplo, contagem bruta por gene ou número de leituras por *kb* por milhão de leituras sequenciadas). Esses valores de abundância podem usar de ferramentas adicionais para comparar a expressão relativa de genes entre condições de crescimento ou durante experimentos ao longo do tempo, cujo o objetivo é frequentemente ajudar a entender quais genes e caminhos podem ser importantes para um fenótipo específico em estudo. Para esses tipos de estudos, muitas vezes são necessárias experiências com replicação para obter resultados estatisticamente significativos, portanto, as comparações relativas de abundância de genes costumam ser uma comparação entre muitas amostras diferentes que incluem várias repetições biológicas.

A disponibilidade de vários fluxos de trabalho permite que os usuários escolham o que é mais apropriado para analisar seu metatranscriptoma. Embora os usuários devam selecionar fluxos de trabalho idealmente com base na capacidade/funcionalidade e qualidade dos algoritmos/ferramentas utilizados, considerações adicionais podem incluir os requisitos de recursos computacionais que variam entre os fluxos de trabalho e a frequência de manutenção ou desenvolvimento ativo do código-fonte, que podem sofrer modificações frequentes à medida que novos avanços, ferramentas ou métodos continuam sendo desenvolvidos. A Tabela 3 é uma compilação desses fluxos de trabalho disponíveis e pode ser usada como um guia em potencial para escolher um fluxo de trabalho com base em fatores importantes para abordar

as perguntas de qualquer pesquisador. Por exemplo, se a análise de expressão diferencial é o objetivo de um estudo, a lista de fluxos de trabalho para escolher é limitada a cinco.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, os estudos metatranscriptômicos são realizados principalmente com tecnologia de *reads* curtas (ou seja, Illumina), exigindo um grande número de ferramentas analíticas para ajudar em todos os aspectos da análise de dados. Nesta revisão, destacamos alguns dos principais métodos de análise de dados de metatranscriptômica, o que impacta diretamente no conhecimento humano da influência do microbioma na saúde humana. Algumas das ferramentas específicas de bioinformática usadas para realizar essas análises e alguns fluxos de trabalhos metatranscriptômicos mais complexos combinam várias dessas ferramentas para abordar questões biológicas com esforço mínimo de usuário menos experientes. Conquanto, para tornar as coisas mais complexas, novos avanços em tecnologias de sequenciamento continuarão impulsionando o desenvolvimento de novas ferramentas e fluxos de trabalho. Um *pipeline* ou *workflow* padrão, uma estrutura, deve ser aceita para comparar novas ferramentas, o que ajudaria no progresso de trabalho e possivelmente se uniria a fluxos de trabalho mais precisos e apropriados. Apesar de alguns dos problemas com a metatranscriptômica como método, o desenvolvimento contínuo de novas ferramentas e algoritmos para análise de dados metatranscriptômicos, juntamente com nossa crescente compreensão dos desafios apresentados por esses conjuntos de dados, fica claro que a próxima geração de ferramentas de metatranscriptômica são uma grande promessa para impulsionar e facilitar nossa compreensão da fração biologicamente ativa de microbiomas das vias relevantes envolvidas.


## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS











- Andrews S (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Bolger AM et al. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- Buchfink B et al. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12: 59–60.
- Bushmanova E et al. (2019). rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience* 8.
- Celaj A et al. (2014). Comparison of assembly algorithms for improving rate of metatranscriptomic functional annotation. *Microbiome* 2: 39. doi: 10.1186/2049-2618-2-39
- Chen S et al. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34: i884–i890.
- Freitas TAK et al. (2015). Accurate read-based metagenome characterization using a hierarchical suite of unique signatures. *Nucleic Acids Res.* 43: e69.

- Grabherr MG et al. et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29:644–652.
- Kim D et al. (2016). Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res.* 26: 1721–1729.
- Klingenberg H et al. (2017). How to normalize metatranscriptomic count data for differential expression analysis. *PeerJ* 5: e3859.
- Kopylova E et al. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28: 3211–3217.
- Leung HCM et al. (2014). IDBA-MTP: a hybrid metatranscriptomic assembler based on protein information. *Res. Comput. Mol. Biol.* 22(5). doi: 10.1007/978-3-319-05269-4\_12
- Leung HCM et al. (2013). IDBA-MT: de novo assembler for metatranscriptomic data generated from next-generation sequencing technology. *J. Comput. Biol.* 20: 540–550.
- Li D et al. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31: 1674–1676.
- Li PE et al. (2017). Enabling the democratization of the genomics revolution with a fully integrated web-based bioinformatics platform. *Nucleic Acids Res.* 45: 67–80.
- Liu J et al. (2016). BinPacker: packing-based de novo transcriptome assembly from RNA-seq data. *PLoS Comput. Biol.* 12: e1004772.
- Lo C-C et al. (2014). Rapid evaluation and quality control of next generation sequencing data with FaQCs. *BMC Bioinf.* 15: 366.
- Love MI et al. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15: 550.
- Meinicke P (2015). UProC: tools for ultra-fast protein domain classification. *Bioinformatics* 31: 1382–1388. d
- Neves ALA et al. (2017). Enhancing the resolution of rumen microbial classification from metatranscriptomic data using Kraken and Mothur. *Front. Microbiol.* 8: 2445.
- Nurk S et al. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 27: 824–834.
- Peng Y et al. (2012). IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28: 1420–1428.
- Rho M et al. (2010). FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Res.* 38: e191.
- Ritchie ME et al. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43: e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
- Robertson G et al. (2010). De novo assembly and analysis of RNA-seq data. *Nat. Methods* 7: 909–912.

- Robinson MD et al. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139–140.
- Rotmistrovsky K et al. (2011). BMTagger: best match tagger for removing human reads from metagenomics datasets.
- Schulz MH et al. (2012). Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics* 28: 1086–1092.
- Seemann T (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30: 2068–2069.
- Tarazona S et al. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res.* 43: e140.
- Truong DT et al. (2015). MetaPhlAn2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat. Methods* 12: 902–903.
- Ugarte A et al. (2018). A multi-source domain annotation pipeline for quantitative metagenomic and metatranscriptomic functional profiling. *Microbiome* 6: 149.
- Wilke A et al. (2016). The MG-RAST metagenomics database and portal in 2015. *Nucleic Acids Res.* 44: D590–D594.
- Wood DE et al. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15: R46.
- Xie Y et al. (2014). SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. *Bioinformatics* 30: 1660–1666.
- Yamada T et al. (2011). iPath2.0: interactive pathway explorer. *Nucleic Acids Res.* 39: W412–W415.
- Ye Y et al. (2009). A parsimony approach to biological pathway reconstruction/inference for genomes and metagenomes. *PLoS Comput. Biol.* 5: e1000465.
- Ye Y et al. (2016). Utilizing de Bruijn graph of metagenome assembly for metatranscriptome analysis. *Bioinformatics* 32: 1001–1008.
- Zhong C et al. (2016). Metagenome and metatranscriptome analyses using protein family profiles. *PLoS Comput. Biol.* 12: e1004991.

# Probióticos: mineração de dados evidencia como uma microbiota intestinal saudável ajuda a combater infecções respiratórias virais agudas, similares à Covid-19

 10.46420/9786588319543cap2

Diego Lisboa Rios<sup>1\*</sup>   
 Silvia de Siqueira Costa<sup>2</sup>   
 Thiago Araújo Andrade<sup>3</sup>   
 Paula Margarita Salazar Torres<sup>4</sup>   
 Lucas Roberto da Silva<sup>5</sup>   
 Pedro Gontijo Carneiro<sup>6</sup>   
 Kerley dos Santos Alves<sup>7</sup>   
 Welington Ribeiro Aquino Marques<sup>8</sup>   
 João Batista Matos Júnior<sup>9</sup>   
 Fabyola Antunes Gonçalves Souza<sup>10</sup> 

## INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, um surto contínuo de pneumonia associada a um novo coronavírus, chamado de Coronavirus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), foi relatado em Wuhan, província de Hubei, China. Nas semanas seguintes, infecções se espalharam pela China e outros países ao redor do mundo (Huang et al., 2020). Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (WHO) declarou o surto uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (PHEIC). Em 12 de fevereiro de 2020, a WHO nomeou a doença causada pelo novo coronavírus como “Doença de Coronavírus 2019” (COVID-19) (WHO, 2020).

Atualmente, sete coronavírus humanos já foram identificados e nomeados em ordem cronológica: *Human Coronavirus 229E (HCoV-229E)*, *Human Coronavirus OC43 (HCoV-OC43)*, *SARS-CoV*, *Human Coronavirus NL63 (HCoV-NL63, New Haven Coronavirus)*, *Human Coronavirus HKU1*, *Middle East Respiratory*

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>2</sup> Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Divinópolis - MG.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>4</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>5</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>6</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>7</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>8</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>9</sup> Instituto Federal do Acre (IFAC), Rio Branco - AC.

<sup>10</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

\* Autor(a) correspondente: lisboa.zootec@gmail.com

*Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)*, SARS-CoV-2. O SARS-CoV-2 é completamente novo para o nosso sistema imunológico. Antes do surto atual, não há evidências de exposição prévia de seres humanos ao SARS-CoV-2. A ausência dessa exposição prévia faz com que nosso sistema imunológico seja susceptível à infecção, causando um enorme número de casos com sintomatologia (tosse, febre, cansaço, dificuldade para respirar) ausente ou de moderada a grave. O aumento da carga viral em hospedeiros imunodeficientes pode ser uma das razões pelas quais o vírus está se espalhando tão rapidamente pela população (Phan et.al., 2020).

O vírus é transmitido através de gotículas produzidas nas vias respiratórias das pessoas infectadas. Ao espirrar ou tossir, essas gotículas podem ser inaladas ou atingir diretamente a boca, nariz ou olhos de pessoas em contato próximo. Estas gotículas podem também depositar-se em objetos e superfícies próximas que podem afetar quem nelas toque e leve a mão aos olhos, nariz ou boca, embora esta forma de transmissão seja menos comum (Chen et al., 2020).

Apesar dos esforços unidos dos sistemas de saúde pública, hospitais e da comunidade científica chinesas, que compartilharam prontamente a sequência genômica do novo vírus com o mundo, uma vacina pode ainda levar meses (Wu et al., 2020). A demora no desenvolvimento de uma vacina faz necessário a busca por tratamentos eficazes para controlar e prevenir à infecção por SARS-CoV-2.

Dados clínicos iniciais mostraram potencial no tratamento de COVID-19 com esses três medicamentos e possíveis agentes: Cloroquina, um medicamento antimalárico; Inibidores de protease como o ritonavir, um medicamento anti-Vírus da imunodeficiência humana (HIV); Remdesivir, um medicamento antiviral usado anteriormente contra o Ebola. Atualmente, ensaios clínicos em larga escala estão em andamento na China e no mundo (Wu et.al., 2020). Com a indisponibilidade de vacina ou de um tratamento clinicamente comprovado, as melhores estratégias de prevenção da infecção pelo SARS-CoV-2 são: realizar higiene pessoal ao lavar as mãos, isolamento social e reforçar o sistema imunológico (Phan et.al., 2020).

Uma poderosa alternativa em meio a esta crise na saúde mundial é o uso de bactérias denominadas probióticas, capazes de interagir com nossa microbioma intestinal e, entre outros benefícios, reforçar o sistema imunológico, aumentar as respostas imunológicas e promover sinalização imunológica específica com relevância fisiológica (Santadati et al., 2015). Probióticos são definidos como organismos vivos com atribuição de promoção da saúde quando ingeridas em número adequado (FAO et al., 2002). Diversos *Lactobacillus spp.* são usados amplamente como aditivo alimentar no tratamento de distúrbios gastrointestinais e ajuste do equilíbrio intestinal (Stjernquist-Desatnik et al., 2000). As bactérias ácido lácticas (LABs) tem atividade antibacteriana e antiviral contra diversos vírus em hospedeiros humanos e animais. Experimentos já mostraram a inibição significativa do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), H1N1 (Gripe Influenza Tipo A ou gripe suína), RSV (Vírus Sincicial Respiratório), TGEV (Coronavírus da

gastroenterite transmissível) *in vitro* e redução da multiplicação viral *in vivo*, com níveis de interferon e outros fatores antivirais elevados (Lee et al., 2015; Chai et al., 2013; Maeda et al., 2009).

Uma variedade de metabólitos, como plantaricina, exopolissacarídeos (EPS), ácido láctico, ácido acético, ácido gama-aminobutírico produzido por probióticos, são capazes de aumentar a imunidade corporal, antitumoral e antiviral (Merenstein et al., 2010).

Diante disso, o presente artigo teve como objetivo apresentar uma revisão de literatura na qual sejam expostos os efeitos benéficos conhecidos do uso de probióticos e seu potencial antiviral e imunomodulador frente à alguns vírus causadores da Síndrome Respiratória Aguda Grave, similares ao SARS-CoV-2.

## METODOLOGIA

Esta pesquisa seguiu os princípios de uma revisão sistemática (Khan et al., 2003), ou seja, com definição a priori dos critérios a serem seguidos em relação ao tipo de estudo, ao período de tempo, à seleção e ao tamanho da amostra, às medidas de desfecho e de associações, à presença de vieses, às perdas de acompanhamento, entre outros. Através desse método, a detecção de todas as publicações dentro do período de busca estabelecido, assim como a seleção e a classificação das mesmas em termos de evidência científica foram seguidas de forma sistemática e padronizada, assegurando o rigor metodológico da presente revisão.

### *Bases de dados, limite de tempo e idiomas*

As buscas foram realizadas em cinco bases de dados bibliográficas — *PubMed*, *Web of Science*, *EMBASE*, *Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature* (CINAHL) e LILACS. Ao finalizar as pesquisas em cada base, as referências duplicadas foram excluídas. Foram selecionados artigos publicados entre 1999 e 2020 (incluindo aqueles disponíveis online em 2020 que poderiam ser publicados em 2020), escritos em inglês, português ou espanhol.

### *Termos livres e critérios de inclusão e exclusão*

Há problemas e diferenças nos processos de indexação nas bases de dados bibliográficas; portanto, optou-se pela busca por termos livres, sem o uso de vocabulário controlado (descritores).

Com essa estratégia, houve uma recuperação de um número maior de referências, garantindo a detecção da maioria dos trabalhos publicados dentro dos critérios pré-estabelecidos. Um dos autores graduado em letras e com experiência em biblioteconomia foi responsável por essa etapa do trabalho. Os termos “*chronic pulmonary disease*”; “*pulmonary disease*”; “*chronic lung diseases*”; COVID-19; “*coronavirus*”,



*“probiotics”, “immunomodulation”; “antiviral”*. Foram combinados com as associações e desfechos de interesse, conforme proposto por Sin e colaboradores (2003).

Foram incluídos todos os artigos originais indexados no período selecionado, com delineamento experimental (ensaios clínicos, randomizados ou não) ou observacional (estudos de caso-controle, estudos de corte e estudos antes e depois), realizados *in vitro*, em cobaias e humanos, nos quais foram avaliados os seguintes desfechos: proteção por imunomodulação, proteção competição, antagonismo, mortalidade, função pulmonar, sintomas, qualidade de vida, efeitos adversos e exacerbações em Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Artigos que analisaram efeitos dos medicamentos sobre processo inflamatório, imunidade, avaliação de custo-efetividade, estudos observacionais com análise transversal, estudos de fase I ou II foram analisados e incluídos quando de acordo com os objetivos do trabalho.

### ***Níveis de evidência científica***

Os níveis de evidência científica (graus de recomendação) utilizados para a classificação das publicações desta revisão estão definidos, conforme os critérios recomendados no relatório *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (2006). A curadoria manual final foi realizada em reuniões com todos os participantes, cada um contribuindo nas respectivas áreas de pesquisa.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### ***Infecções respiratórias virais agudas***

As Infecções do trato respiratório superior (URI), como as causadas pela COVID-19, estão entre os problemas de saúde mais comuns em humanos (Santadati et al., 2015). Mesmo na ausência de pandemia, nos EUA, 25 milhões de consultas médicas são feitas por ano devido às URI. Em 2016, as doenças do sistema respiratório representaram 8,2% de todas as mortes na União Europeia (Huang et al., 2020).

Sabe-se que mais de 200 vírus causam infecções respiratórias em humanos. Os agentes causadores mais comuns são o Coronavírus, Vírus Sincicial Respiratório (RSV), Vírus Parainfluenza, Enterovírus (EV), Vírus Influenza e Adenovírus, sendo o principal o Rinovírus Humano (HRV). Os sintomas da URI surgem após um período de incubação que varia dependendo do agente causador (Araujo, 2015).

### ***Etiologia da COVID-19***

Os coronavírus são vírus conhecidos por causar infecções respiratórias e geralmente provocam resfriados leves. São associados à um terço dos casos registrados no mundo em épocas mais frias. O prefixo “corona”, do latim coroa, deve-se à sua aparência de coroa solar devido a picos de proteínas em sua superfície medindo de 9 à 12 nm de comprimento (Phan et al., 2020). Em relatório preliminar, a análise completa do genoma viral revela que o vírus compartilha 88% da identidade de sequência com dois



coronavírus do tipo “Síndrome Respiratória Aguda Grave” (SARS) (bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21), derivados de morcegos. No entanto, o genoma é mais distante do Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), 79%, e do Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), 50%. Por isso, foi chamado temporariamente de novo coronavírus 2019 (2019-nCoV) (Roujian et al., 2020). O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples e polaridade positiva, com alta capacidade de mutação, e que por ter aproximadamente 29.903 nucleotídeos, é considerado um dos maiores vírus de RNA conhecido (Chen et al., 2020).

Existem quatro proteínas estruturais principais codificadas pelo genoma coronaviral, uma das quais é a proteína *spike* (S). Esta proteína transmembrana se liga ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e medeia a fusão subsequente entre o envelope, contendo o RNA viral, e as membranas celulares do hospedeiro para, assim, facilitar a entrada na célula hospedeira (Huang et al., 2020). Em 11 de fevereiro de 2020, o Grupo de Estudos sobre Coronavírus (CSG) do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) finalmente o designou como Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) com base na filogenia, taxonomia e prática estabelecida (Chen et al., 2020). Logo depois, a WHO nomeou a doença causada por este coronavírus como Doença de Coronavírus 2019 (COVID-19). Com base nos dados atuais, o SARS-CoV-2 pode ter infectado inicialmente morcegos e transmitido aos seres humanos via pangolim, ou outros animais selvagens vendidos no mercado de frutos do mar de Huanan. A partir daí, a disseminação ocorreu via transmissão de humano para humano (Phan et al., 2020).

### ***Epidemiologia da “Doença de Coronavírus 2019”***

Evidências de grupos de familiares infectados e trabalhadores médicos confirmaram a presença de transmissão homem a homem por gotículas de saliva, contato e fômite. As estimativas atuais são de que o SARS-CoV-2 tem um período médio de incubação de 3 dias (faixa de 0 a 24 dias), com potencial transmissão assintomática (Huang et al., 2020).

Em dezembro de 2019, apareceram os primeiros sintomas em pacientes já confirmados. No início a morbidade permaneceu baixa, mas atingiu um ponto de inflexão em meados de janeiro de 2020. Na presente data, 2 de abril de 2020, o número mundial de casos confirmados é de 900.306, em 206 países, com um total de mortes de 45.693 (WHO, 2020).

Apesar dos alarmantes números de mortes, a taxa de letalidade do novo vírus é em média 3,4%, menor do que a da SARS (8%) e da dengue (3,8%), sendo que de 80% das pessoas que forem infectadas terão um quadro respiratório leve, muito semelhante a uma gripe. Dos outros 20%, o quadro pode evoluir com falta de ar e, numa parcela 5 a 10% deles, será necessária a assistência ventilatória, levando à internação hospitalar. Além disso, existem certos grupos chamados de risco. Na comparação da faixa etária, os grupos

de maior vulnerabilidade são dos 70 à 79 anos (8%) e mais de 80 (14,8%). Dentre os fatores que aumentam a letalidade, temos o câncer (6,2 vezes), hipertensão (6,7 vezes), doenças respiratórias crônicas (7 vezes), diabetes (8,1 vezes) e doenças cardiovasculares (11,7 vezes) (Wu et.al., 2020).

Com a indisponibilidade de vacinas e tratamentos comprovadamente eficazes, o controle da COVID-19 é a única alternativa neste momento. Medidas eficazes de prevenção e controle devem incluir detecção, diagnóstico, tratamento dos casos graves em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e quarentena precoces, para bloquear a transmissão de pessoa para pessoa, além de reduzir infecções secundárias entre contatos próximos e profissionais de saúde (Huang et al., 2020). Um sistema imunológico preparado, forte e saudável, poderia ser a diferença no nível de gravidade dos sintomas da COVID-19, principalmente nas pessoas do grupo de risco (Phan et.al., 2020).

### ***Probióticos e seus efeitos comprovados na saúde***

Os probióticos devem atender aos seguintes critérios: devem sobreviver no trato gastrointestinal e serem capazes de proliferar no intestino; devem beneficiar o hospedeiro através do crescimento ou atividade; e não devem ser patogênicos ou tóxicos (Yang et al., 2017). Características probióticas podem ser encontradas em diversos gêneros, espécies e linhagens de microrganismos. Embora evidências recentes sugiram que cada linhagem tenha alguns efeitos comuns à saúde, estas ainda apresentam muitos efeitos específicos na saúde (Santadati et al., 2015). Os organismos probióticos mais comuns são bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Stjernquist-Desatnik et al., 2000). Descobertas usando metanálises de probióticos de linhagens específicas, sugerem que os benefícios comuns à saúde são derivados do consumo de uma dose adequada de qualquer linhagem segura, já conhecida por ser um probiótico eficaz. Por exemplo, uma metanálise usando diferentes linhagens em 10.351 pacientes, constatou que os probióticos tiveram um efeito positivo em oito doenças gastrointestinais em todas as espécies probióticas estudadas (Yang et al., 2017).

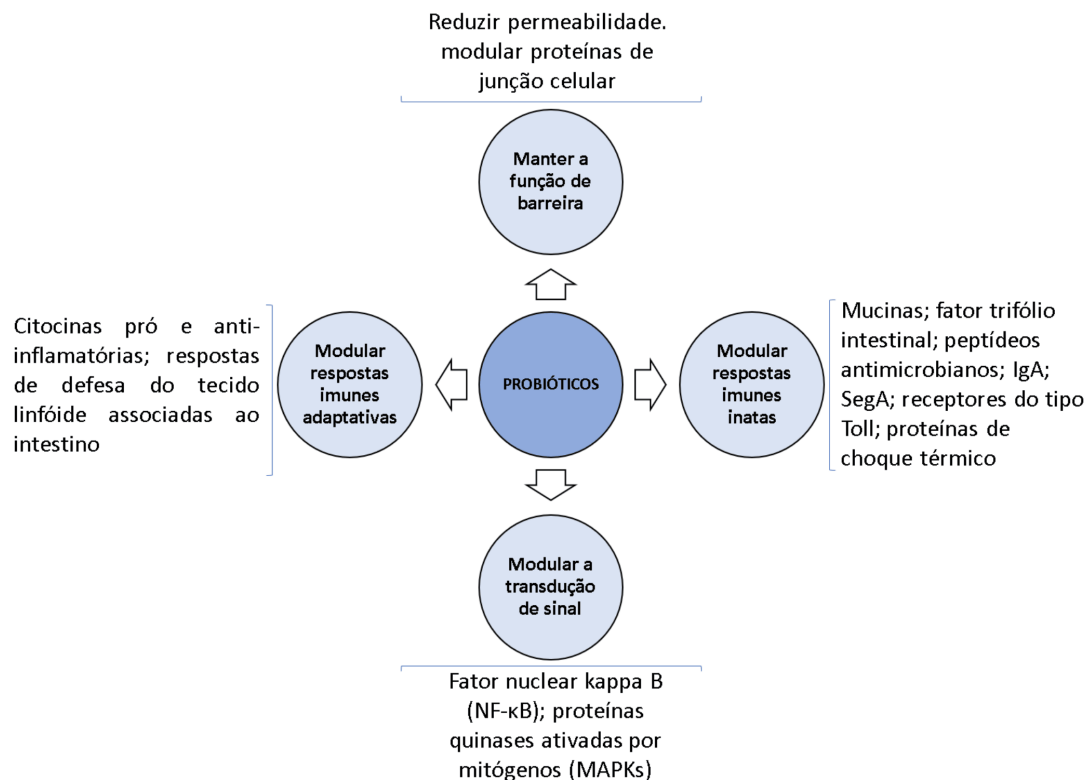
Organização Mundial de Alergia (WAO) convocou um painel de diretrizes para desenvolver recomendações baseadas em evidências científicas para o uso de probióticos na prevenção de alergias (Yang et al., 2017). Existem ainda evidências para apoiar o uso de probióticos em várias condições: prevenção de gastroenterite aguda, enterocolite necrosante, diarreia associada à antibióticos, constipação, síndrome do intestino irritável, doenças inflamatórias intestinais, intolerância à lactose, alergias, eczema atópico, certos tipos de câncer, doenças hepáticas, hiperlipidemia, infecção por *Helicobacter pylori*, infecções do trato geniturinário e saúde bucal (Yang et al., 2017). A Associação Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN) também estabeleceu recomendações para o uso de probióticos na prevenção e tratamento de gastroenterite aguda em crianças (Tapiovaara et al., 2014). Além disso, metanálise de linhagem probiótica específica concluiu que o *Lactobacillus rhamnosus* GG (L. GG) era

eficaz na prevenção da diarreia associada à antibióticos em crianças e adultos tratados com antibióticos por qualquer motivo (Swanlung et al., 2015).

### ***Mecanismos de ação - Probióticos***

Os mecanismos de ação dos probióticos em infecções virais e bacterianas ainda não são completamente compreendidos. Linhagens específicas, exibem potenciais probióticos específicos, reforçando a integridade do epitélio intestinal e regular componentes do sistema imunológico. Na regulação de respostas imunes complexas, o trato gastrointestinal da cavidade oral ao reto, é considerado a maior interface imune do hospedeiro com o meio ambiente. Os potenciais mecanismos são estudados principalmente no epitélio gastrointestinal. Os potenciais mecanismos de ação no trato respiratório permanecem desconhecidos, e mecanismos semelhantes aos do epitélio intestinal podem existir, mas o tópico precisa ser mais estudado (Yang et al., 2017). Alguns mecanismos postulados de ação probiótica na defesa epitelial intestinal são apresentados na (Figura 1).

É possível que bactérias probióticas possam se ligar a um vírus invasor, inibindo assim a ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira (Salminen et al., 2010). As LABs podem exercer atividade antiviral das seguintes maneiras: interação direta como um mecanismo de adsorção ou captura; estimulação do sistema imunológico por interleucina, células “assassinas” naturais, atividade de resposta imune celular do tipo Th1 e produção de IgA; produção de agentes antivirais (por exemplo, peróxido de hidrogênio, ácido láctico e bacteriocinas) (Araújo, 2015).



**Figura 1.** Possíveis mecanismos pelos quais as bactérias probióticas modulam as respostas de defesa intestinal. Fonte: Rios et al., 2020; dados extraídos de Salminen et al., 2010; Araújo, 2015; Yang et al., 2017.

### *Microbiota do trato respiratório e suas implicações na saúde*

A microbiota nasofaríngea e adenóide (MNA) é um sistema interativo complexo, abrigando uma grande variedade de bactérias e vírus. Em crianças, observou-se que a MNA mudava de acordo com a estação, e as proporções de táxons mudavam com o uso de antibióticos. Sendo ainda demonstrado que os vírus respiratórios realizam alterações na adesão bacteriana, colonização e mecanismos imunológicos, na nasofaringe (Yang et al., 2017).

A MNA pode afetar a vulnerabilidade dos indivíduos a infecções respiratórias. Um estudo demonstrou que crianças pequenas apresentavam pequena variedade de táxons e altas contagens totais de bactérias em sua nasofaringe. Ao contrário de seus pais, que apresentavam muita variedade de táxons e contagem bacteriana baixa. Esse achado sugere que uma maior variedade de MNA poderia proteger o indivíduo contra a URI (Yang et al., 2017).

É possível ainda que a maturação da comunidade microbiana associada ao hospedeiro ocorra de maneira semelhante na área nasofaríngea e no intestino. Curiosamente, o desenvolvimento da MNA já foi estudado em 60 crianças saudáveis, e certos padrões de microbiota foram associados a reduções nos

episódios de URI relatados pelos pais. Diante disto, os cientistas começaram a investigar o efeito da adição de bactérias benéficas na microbiota intestinal e respiratória de adultos e crianças (Santadati et al., 2015).

### *Colonização do trato respiratório com probióticos*

A colonização do epitélio intestinal por probióticos têm sido extensivamente estudadas (Alander et al., 1999). Experimentos já identificaram que a adesão na mucosa, apesar de importante, é incorretamente ensinada como essencial para os mecanismos de defesa imunológica e não imune na mucosa. Por exemplo, probióticos não colonizadores, como *Lactobacillus casei*, podem exercer suas funções de maneira transitória ou influenciar a comunidade microbiana existente (Merenstein et al., 2010).

Já a colonização do epitélio do sistema respiratório com probióticos específicos ou bactérias do ácido láctico, ainda não é muito bem conhecida. Em um estudo piloto, foi observada a presença do probiótico *Lactobacillus plantarum* DSM9843 a partir da superfície tonsilar de 6 indivíduos no prazo de até oito horas após o consumo por via oral de mingau de aveia fermentado e enriquecido com este probiótico, sugerindo que a cepa pode possuir a capacidade de adesão às células tonsilares (Stjernquist-Desatnik et al., 2000).

Em outro estudo populacional da microbiota, foi investigado a recuperação de *Streptococcus salivarius* K12 na nasofaringe e na cavidade oral após a ingestão oral. Neste estudo, uma das 19 culturas nasofaríngeas foi relatada positiva para o probiótico e foi recuperada de três adenóides, das sete examinadas (Power et al., 2008).

Ainda, um experimento tratou 20 adultos com *Streptococcus salivarius* 24SMBc intranasal por três dias. Os resultados mostraram que 95% dos indivíduos foram colonizados na nasofaringe com o probiótico pelo menos quatro horas após a administração do spray, a colonização persistiu por pelo menos seis dias em 55% dos indivíduos (Santadati et al., 2015).

A recuperação tonsilar de *Lactobacillus rhamnusus* (GG), após consumo oral foi estudada em 57 adultos jovens por estudo controlado com placebo e randomizado. L. GG foi recuperado em 40% das amostras tonsilares dos grupos L. GG e em 30% das amostras dos grupos placebo (Kumpu et al., 2013). O L. GG também foi recuperado do tecido adenóide de crianças que consumiram o probiótico por via oral em um experimento randomizado, duplo-cego. Nestes casos, todos os indivíduos que consumiram L. GG apresentaram a bactéria na adenóide, bem como 76% das amostras dos grupos placebo foram positivas (Swanljung et al., 2015). Vinte e cinco amostras de efusão do Fluido do Ouvido Médio (MEF) da mesma população de estudo foram estudadas em outro trabalho. Neste, 21% dos grupos tratados com L.GG, mantiveram a permanência deste probiótico. No entanto, apenas 7% dos grupos placebo apresentaram L.GG no MEF (Tapiovaara et al., 2014). A descrição dos estudos, que investigaram a colonização do trato respiratório com probióticos, são apresentados na (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características dos estudos anteriores que investigaram a colonização do trato respiratório com probióticos; RDBPC = ensaio clínico prospectivo, randomizado, controlado por placebo; UFC = unidade formadora de colônia. Fonte: Rios et al., 2020.

Temas	Metodologia e duração	Suplementação probiótica	Principais conclusões	Referência
Voluntários saudáveis, com idade média de 38 anos (n = 6).	Amostras de zaragatoa de amígdalas, após administração única por via oral.	<i>L. plantarum</i> ( $2 \times 10^{11}$ UFC)	A colonização permaneceu por 8 horas.	Stjernquist-Desatnik et al., 2000.
Crianças agendadas para timpanostomia, com idade entre 0,5 e 5 anos (n = 19).	Amostras de swab da língua e nasofaringe, 10 dias.	<i>S. salivarius</i> K12 ( $1,7 \times 10^{10}$ UFC).	33% colonizados.	Power Da et al., 2008.
Jovens agendados para amigdalectomia, com idade média de 24,5 anos (n = 57).	Amostras de tecido da amígdala RDBPC, 3 semanas.	L.GG ( $2 \times 10^{10}$ UFC) ou multiespécies L.GG, Lc705, PJS, BB12.	30-40% de colonizados em diferentes grupos de intervenção.	Kumpu et al., 2013.
Adultos saudáveis com idade entre 30 e 54 anos (n = 20).	Spray nasal, zaragatoas rinofaríngeas, 3 dias.	<i>S. salivarius</i> 24SMBc ( $8 \times 10^9$ ufc).	95% colonizados, 55% permaneceram por seis dias.	Santagati et al., 2015.
Crianças agendadas para adenotomia, com média de idade de 37,8 meses (n = 31).	Amostras de adenóide RDBPC, 3 semanas.	L. GG ( $8-9 \times 10^9$ UFC) x 2.	100% colonizado no grupo L. GG, 76% no grupo placebo.	Swanljung et al., 2015.
Crianças agendadas para timpanostomia, com idade média de 31 meses (n = 13).	Amostras RDBPC, MEE, 3 semanas.	L. GG ( $8-9 \times 10^9$ UFC) x 2.	21% colonizados no grupo L.GG, 7% no grupo placebo.	Tapiovaara et al., 2014.

Identificada a colonização por bactérias probióticas benéficas ao organismo, investigou-se o impacto destas na proteção e imunomodulação do hospedeiro diante de infecções virais.

### *Efeitos clínicos dos probióticos no trato respiratório*

A prevenção de infecções respiratórias pelo uso de probióticos vem sendo estudada por vários experimentos. Por exemplo, L.GG sozinho ou em combinação com outros probióticos demonstrou

reduzir a incidência ou o risco de URI em crianças (Hatakka et al., 2001). Uma revisão sistemática recente encontrou um resultado favorável ao uso de probióticos na redução dos episódios de novas URI em crianças (Araújo, 2015). No Banco de Dados Cochrane de Revisões Sistemáticas (CDSR), encontra-se trabalho sobre o uso de probióticos em URI, no qual categorizou 13 ensaios clínicos randomizados com participantes em várias faixas etárias, (Tabela 2). Verificou-se que os probióticos eram melhores que o placebo na redução do número de indivíduos que experimentaram URI, havendo ainda redução na duração média desta, no número de prescrições de antibióticos e nas faltas escolares relacionadas ao frio (Hao et al., 2015).

**Tabela 2.** Características dos estudos controlados randomizados; RD = randomizado, B = controlado por placebo, P = prospectivo, C = ensaio clínico. **Fonte:** Rios et al., 2020.

Temas	Metodologia e duração	Suplementação probiótica	Principais conclusões: Probiótico vs. placebo	Referência
Adultos saudáveis com idade entre 18 e 65 anos (n = 318).	RDBPC, 3 meses.	<i>L. plantarum</i> e <i>L. paracasei</i> ( $1 \times 10^9$ UFC).	Incidência de episódios de resfriado comum ↓ Número de dias com sintomas respiratórios ↓ Número e duração de URI ↔ Nível de IgA secretora ↑	Berggren et al. 2011.
Creches de 1 a 5 anos (n = 398).	RDBC, 3 meses.	<i>L. rhamnosus</i> HN001 ( $10^{10}$ UFC).	Número de URI aguda e escore de sintomas ↔ Risco de URI ↓	Caceres et al. 2010.
Voluntários mais velhos em creches (n = 154).	RDBPC, 5 meses.	<i>L. casei</i> estirpe <i>Shirota</i> ( $4 \times 10^{10}$ UFC).	Dias com sintomas respiratórios ↓ Risco de URI ↓	Fujita et al. 2013.
Creches com idade entre 13 e 86 meses (n = 281).	RDBPC, 3 meses.	<i>L. rhamnosus</i> GG ( $10^9$ UFC).	Episódios de URI > 3 dias ↓	Hojsak et al. 2010a.
Hospitalizado em pediatria, acima de 1 ano (n = 742).	RDBPC, tempo de internação.	<i>L. rhamnosus</i> GG ( $10^9$ UFC).		Hojsak et al. 2010b.

Voluntários saudáveis com idades entre 69 e 80 anos (n = 60).	RPC, 2 ou 3 meses.	<i>L. bulgaricus</i> (1,8 - 3,2x10 <sup>10</sup> UFC) e <i>S. thermophilus</i> (5,7 - 7,9 x 10 <sup>10</sup> UFC).	Risco de URI ↓ Atividade natural de células assassinas ↑	Makino et al. 2010.
Creche saudável ou crianças em idade escolar de 3-6 anos (n = 638).	RDBPC, 3 meses.	<i>L. casei</i> (2x10 <sup>10</sup> UFC), <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> (10 <sup>9</sup> UFC)	Incidência de doenças infecciosas comuns ↓	Merenstein et al. 2010.
Bebês que necessitam de fórmula com idade entre 0-2 meses (n = 81).	RDBPC, 12 meses.	<i>L. rhamnosus</i> e <i>B. lactis</i> BB-12 (1x10 <sup>10</sup> UFC).	Risco de URI ↓ Risco de OMA e antibióticos ↓ Sintomas da URI ↓	Rautava et al. 2009.
Crianças saudáveis de 8 a 13 anos (n = 80).	RDBPC, 3 meses.	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. bifidum</i> (1x10 <sup>9</sup> UFC).	Ausências na escola relacionadas à URI ↓ Episódios de infecções do trato respiratório ↓	Rerksupphaphol et al. 2012.
Crianças de 6 a 25 meses (n = 100).	RPC, 3 meses.	<i>L. acidophilus</i> e <i>L. casei</i> (10 <sup>9</sup> - 10 <sup>10</sup> UFC).	Duração das infecções respiratórias inferiores ↓	Río et al. 2002.
Crianças em idade escolar de 3 a 12 anos (n = 251).	RDBPC, 5 meses.	<i>L. casei</i> .	Duração ou URI ↓ Média da pontuação da gravidade ↓ Dias de aula perdidos ↓ Duração da URI ↓ Escore total de sintomas ↓ Dias com febre durante a URI ↓	Sanz et al. 2006.
Estudantes universitários de 18 a 24 anos (n = 198).	RDBPC, 3 meses.	<i>L. rhamnosus</i> GG e <i>B. animalissp. lactis</i> BB-12.		Smith et al. 2013.
Adultos saudáveis, idade média 38 ± 13 (n = 479).	RDBPC, 8,5 meses.	<i>L. gasseri</i> , <i>B. longum</i> e <i>B. bifidum</i> (5x10 <sup>7</sup> ufc).		De Vrese et al. 2005.



Uma metanálise com estudos randomizados e controlados por placebo, indica que o L. GG é capaz de reduzir a incidência de Otite Média Aguda (OMA), prescrições de antibióticos e o risco de URI em crianças (Liu et al., 2013). No entanto, em crianças propensas a otite com colonização por patógenos nasofaríngeos, o L. GG não reduziu a ocorrência de OMA (Hatakka et al., 2007).

Novo modelo de tratamento da bacterioterapia intranasal por spray com *Streptococcus sanguinis* e L.GG, mostrou-se eficaz na diminuição do MEF em crianças com prolongada Otite Média com Efusão (OME). A recuperação de ambos os probióticos foi estatisticamente significativa (Skovbjerg et al., 2009). Em crianças propensas a otite, o consumo de L. GG, Lc705, BB99 e PJS reduziu significativamente o número de amostras nasofaríngeas positivas de bocavírus humano (Lehtoranta et al., 2012). Além disso, o L. GG foi recuperado do tecido epitelial das amígdalas, após o consumo oral e apresentando ainda, adesão prolongada (acima de 4 semanas) (Kumpu et al., 2013). Experimento *in vitro* indicou que L. GG é capaz de inibir a aderência do *Streptococcus pneumoniae* às células epiteliais humanas (Wong et al., 2000).

Dois estudos de revisão sugeriram que algumas linhagens de probióticos específicas interagem com patógenos, e têm o potencial de reduzir a colonização destes na nasofaringe, reduzindo potencialmente a OMA e a URI (Salminen et al., 2010).

### ***Lactobacillus plantarum* possui efeito antiviral *in vitro* contra Coronavírus**

O TGEV pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Alphacoronavirus*, espécie *Alphacoronavirus 1*, sendo o SARS-COV-2, do gênero *Betacoronavirus*, espécie *Sarbecovirus*. O TGEV causa problemas respiratórios e diarreia graves (Yang et al., 2017).

Yang e colaboradores (2017) demonstraram *in vitro* que o mecanismo antiviral do probiótico *Lactobacillus plantarum* inclui a colonização do epitélio, impedindo estereotipicamente a adesão do TGEV à superfície. Ainda ocorre a ligação entre receptores do probiótico (como pAPN) e o vírus, formando complexos. Não obstante, os probióticos e seus metabólitos também podem interferir indiretamente com o vírus, alterando o estado das células, além de estimular a imunidade inata ou adaptativa. A Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) revelou que os sobrenadantes do probiótico podem conter aproximadamente 123 compostos, sendo mais alta a proporção de moléculas de açúcar. Já a análise por método *Methylthiazolyl-diphenyl-Tetrazolium Bromide* (MTT) indicou que a principal substância antiviral é o EPS. A surfactina, outro metabólito produzido por *Lactobacillus plantarum*, têm atividade antiviral contra o TGEV. Ela entra nas células IPEC-J2 absorvendo partículas de vírus e bloqueando a ligação viral por inibição competitiva. Metabólitos dos probióticos ainda poderiam ter um efeito inibitório direto na proliferação do vírus, como entrar diretamente no núcleocapsídeo para destruir o RNA viral, afetando a montagem das partículas do vírus e produzindo compostos tóxicos ao vírus.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta revisão propõe-se elucidar a importância do reforço do sistema imunológico pelo uso de probióticos, como estratégia válida frente a (URI), similares à COVID-19. Salientamos ainda, que a manutenção de uma diversidade microbiana intestinal saudável e, por consequência, da imunidade do hospedeiro, tem impacto ainda mais acentuado nos grupos de risco, por estes já estarem em situação de maior vulnerabilidade imunológica. Apesar de ainda não existirem dados do efeito de probióticos em pacientes infectados com o SARS-CoV-2, estudos sobre os efeitos de probióticos em infecções causados por outros vírus causadores de URI, sugerem potencial efeito benéfico na saúde da população em meio a pandemia viral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alander M et al. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 351-354.
- Araujo GV et al. (2015). Probiotics for the treatment of upper and lower respiratory-tract infections in children: systematic review based on randomized clinical trials. *J. Pediatr.*, 91: 413-427.
- Berggren A et al. (2011). Randomised, double-blind and placebo-controlled study using new probiotic lactobacilli for strengthening the body immune defence against viral infections. *Eur. J. Nutr*, 50: 203-210.
- Caceres P et al. (2010). Effects of HN001 on acute respiratory infections and intestinal secretory IgA in children. 2010; 5: 353-362.
- Chai W et al. (2013). Antiviral effects of a probiotic enterococcus faecium, strain against transmissible gastroenteritis coronavirus. *Archives of Virology*, 158: 799-807.
- Chen Y et al. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*, 92(4): 418-423.
- De Vrese M et al. (2005). Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clin.Nutr*, 24: 481-491.
- FAO (2002). Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.
- Fujita R et al. (2013). Decreased duration of acute upper respiratory tract infections with daily intake of fermented milk: a multicenter, double-blinded, randomized comparative study in users of day care facilities for the elderly population. *Am. J. Infect. Control.*, 41: 1231-1235.


- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2006). Global Strategy for Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Bethesda: National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute.
- Hao Q et al. (2015). Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. Cochrane Database Syst. Rev, 2: CD006895.
- Hatakka K et al. (2001). Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. BMJ 322: 1327.
- Hatakka K et al. (2007). Treatment of acute otitis media with probiotics in otitis-prone children-a double-blind, placebo-controlled randomised study. ClinNutr, 26: 314-321.
- Hojasak I et al. (2010). Lactobacillus GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. ClinNutr, 29: 312-316.
- Hojasak I et al. (2010). Lactobacillus GG in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. Pediatrics, 125: e1171-1177.
- Huang C et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Pii., S0140-6736(20): 30183-5.
- Khan KS et al. (2003). Systematic Reviews to Support Evidence-Based Medicine. How to Review and Apply findings of Health Care Research. Abington: RSM Press.
- Kumpu M et al. (2013). Recovery of probiotic Lactobacillus rhamnosus GG in tonsil tissue after oral administration: randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. Br. J. Nutr., 109: 2240-2246.
- Lee DK et al. (2015). Probiotic bacteria, B. longum and L. acidophilus inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. Clinics & Research in Hepatology & Gastroenterology, 39: 237-244.
- Lehtoranta L et al. (2012). Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 76: 206-211.
- Liu S et al. (2013). Lactobacillus rhamnosus GG supplementation for preventing respiratory infections in children: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. Indian Pediatr, 50: 377-381.
- Maeda N et al. (2009). Oral administration of heat-killed lactobacillus plantarum l-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type i interferon production in mice. International Immunopharmacology, 9: 11-22.
- Makino S et al. (2010). Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1. Br J. Nutr., 104: 998-1006.

- Merenstein D et al. (2010). Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study. A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Eur.J.Clin.Nutr*, 64: 669-677.
- Phan LT et al. (2020). Importation and human-to-human transmission of a novel coronavirus in Vietnam. *NEJM*. January 28.
- Power DA et al. (2008). Preliminary investigations of the colonisation of upper respiratory tract tissues of infants using a paediatric formulation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 27: 1261-1263.
- Rautava S et al. (2009). Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*, 101: 1722-1726.
- Rerksupphaphol S et al. (2012). Randomized controlled trial of probiotics to reduce common cold in schoolchildren. *PediatrInt*, 54: 682-687.
- Río ME et al. (2002). The nutritional status change the effectiveness of a dietary supplement of lactic bacteria on the emerging of respiratory tract diseases in children. *Arch Latinoam Nutr*, 52: 29-34.
- Roujian L et al. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding.
- Salminen S et al. (2010). Interaction of probiotics and pathogens--benefits to human health? *CurrOpinBiotechnol*, 21: 157-167.
- Santagati M et al. (2015). Colonization, safety, and tolerability study of the *Streptococcus salivarius* 24SMBc nasal spray for its application in upper respiratory tract infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 34: 2075-2080
- Sanz JM et al. (2006). Effect of *Lactobacillus casei* on the incidence of infectious conditions in children. *NutrHosp*, 21: 547-551.
- Sin DD et al. (2003). Contemporary management of chronic obstructive pulmonary disease: scientific review. *JAMA.*, 290(17): 2301-12.
- Skovbjerg S et al. (2009). Spray bacteriotherapy decreases middle ear fluid in children with secretory otitis media. *Arch Dis Child*, 94: 92-98.
- Smith TJ et al. (2013). R. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* L.GG(R) and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12(R) on health-related quality of life in college students affected by upper respiratory infections. *Br. J. Nutr.*, 109: 1999-2007.
- Stjernquist-Desatnik A et al. (2000). Persistence of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 on human tonsillar surface after oral administration in fermented oatmeal gruel. A pilot study. *ActaOtolaryngol.*, 543: 215-219.

- Swanljung E et al. (2015) *Lactobacillus rhamnosus* GG in adenoid tissue: Double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Acta Otolaryngol*, 135: 824-830.
- Tapiovaara L et al. (2014). *Lactobacillus rhamnosus* GG in the middle ear after randomized, double-blind, placebo-controlled oral administration. *Int.J.Pediatr.Otorhinolaryngol*, 78: 1637-1641.
- Wong SS et al. (2013). Inhibition of *Streptococcus pneumoniae* adherence to human epithelial cells in vitro by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *BMC Res.Notes*, 6: 135.
- World health organization (2005). Statement on the second meeting of the International Health Regulations Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV), 2020.
- Wu D et al. (2020). The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int J Infect Dis*, Mar 11.
- Yang Y et al. (2017). Antiviral Effects of a Probiotic Metabolic Products against Transmissible Gastroenteritis Coronavirus. *J Prob Health*, 5: 184.


## Capítulo III

## Remdesivir: mineração de dados e bioinformática sugerem ação no controle do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-Cov-2)

 10.46420/9786588319543cap3


Diego Lisboa Rios<sup>1\*</sup> 


Silvia de Siqueira Costa<sup>2</sup> 

Thiago Araújo Andrade<sup>3</sup> 

Paula Margarita Salazar Torres<sup>4</sup> 

Lucas Roberto da Silva<sup>5</sup> 

Pedro Gontijo Carneiro<sup>6</sup> 

Kerley dos Santos Alves<sup>7</sup> 

Wellington Ribeiro Aquino Marques<sup>8</sup> 

João Batista Matos Júnior<sup>9</sup> 

Fabyola Antunes Gonçalves Souza<sup>10</sup> 

### INTRODUÇÃO

A explosão do novo Coronavírus 2019, oficialmente conhecido como Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), emergiu como uma crise de saúde mundial e, logo a Organização de Saúde Mundial (OMS) decretou pandemia (Tu et al., 2020). A doença pelo Coronavírus 2019 (COVID-19) é uma síndrome respiratória causada por uma nova infecção por SARS-CoV-2. O novo SARS-CoV-2 pertence à família dos Coronavírus, gênero dos BetaCoronavírus e foi descoberto pela primeira vez no mês de dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China. Os Coronavírus são vírus de RNA fita simples (ssRNA) de sentido positivo, com tamanho genômico de 29,9 kb (Wang et al., 2020). O novo SARS-CoV-2 possui alta semelhança filogenética com o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e com o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (Chan et al., 2020). Entretanto, SARS-CoV-2 possui de 10 a 20 vezes mais

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>2</sup> Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Divinópolis - MG.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>4</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>5</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>6</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>7</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>8</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>9</sup> Instituto Federal do Acre (IFAC), Rio Branco - AC.

<sup>10</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

\* Autor(a) correspondente: lisboa.zootec@gmail.com

afinidade com o seu alvo nas células hospedeiras humanas, além de se replicar 3 vezes mais que o SARS-CoV (Wrapp et al., 2020). Medidas de contenção em todo o mundo foram tomadas para combater o surto de COVID-19, no entanto o vírus atingiu rapidamente todo o mundo e os casos aumentam constantemente. Até 6 de novembro de 2020, foram registrados 48.534.508 casos confirmados e 1.231.017 mortes em todo o mundo (WHO, 2020). Os sintomas mais comuns entre pacientes acometidos com a COVID-19 são febre, náusea, fadiga, tosse seca, diarreia ou outro tipo de distúrbios gastrointestinais. A doença tem sintomas mais brandos em comparação ao SARS-CoV e MERS-CoV, no entanto o SARS-CoV-2 se dissemina com maior rapidez (Kwong et al., 2020).

O processo de infecção do SARS-CoV-2 já é bem conhecido e tem fornecido importantes informações, tanto sobre a progressão da infecção, quanto sobre a resposta do sistema imune e o desenvolvimento de estratégias para possíveis terapias antivirais. A infecção se inicia com a interação do domínio de ligação do receptor (RBD) da proteína *Spike* da superfície do vírus ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) da superfície celular. Assim, ocorre a fusão da membrana viral com a célula hospedeira e a liberação do genoma viral para o citoplasma, que posteriormente é transcrito e traduzido em proteínas não estruturais utilizando a maquinaria da célula hospedeira. As proteínas não estruturais formam um complexo de replicação e transcrição chamado de complexo RNA replicase-transcriptase que geram fitas de RNA negativas a partir do molde de RNA sentido positivo. Esta nova fita será posteriormente traduzida em proteínas estruturais do vírus (Feng et al., 2020)

Após todo esse processo, no citoplasma da célula infectada, glicoproteínas estruturais virais recém-montadas são inseridas nas membranas de tráfego intracelular localizadas entre o retículo endoplasmático e o Complexo de Golgi, que se combinam com o RNA genômico para a montagem de novos vírus. As vesículas contendo essas partículas são liberadas por exocitose para infectar as células vizinhas. Cada uma das células infectadas tem capacidade de produzir milhares de novas partículas virais, que podem se espalhar para os brônquios e atingir os alvéolos, podendo causar pneumonias, outras infecções respiratórias ou, em casos mais graves, insuficiência respiratória e morte (Feng et al., 2020; Huang et al., 2020; Tay et al., 2020).

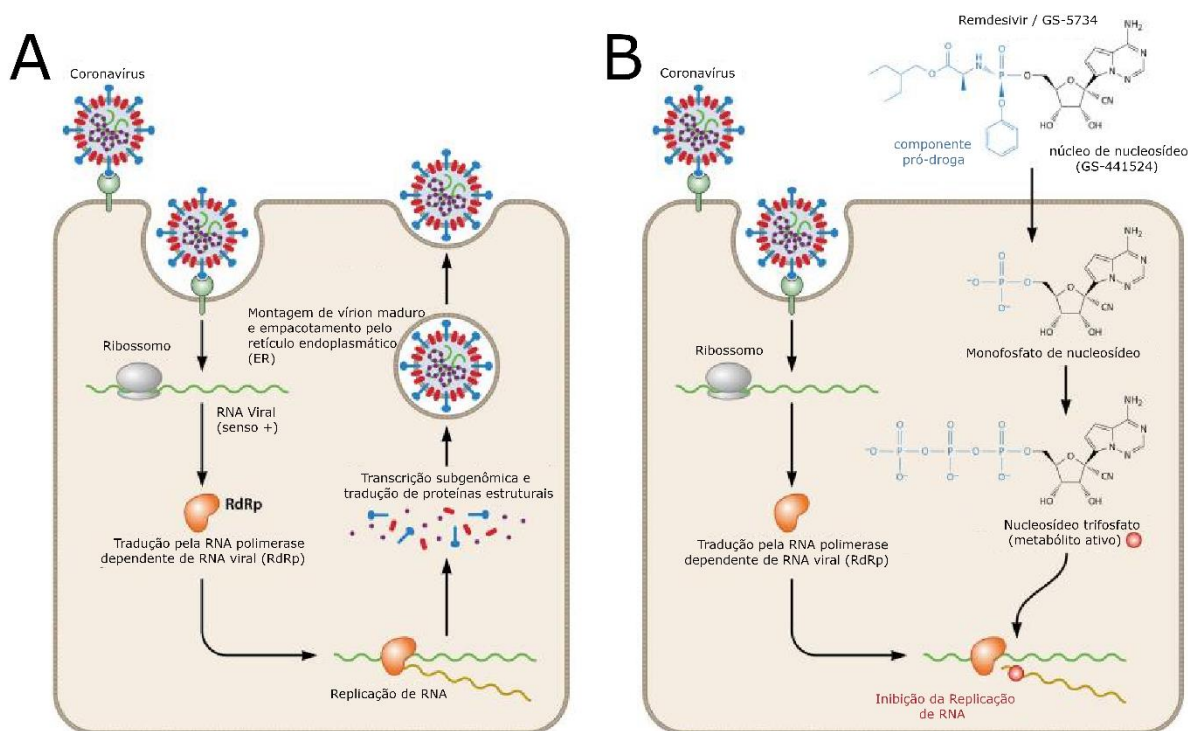
Pesquisas estão em andamento para descobrir drogas de ação rápida para a COVID-19. Muitos estudos investigam medicamentos reutilizáveis usados na terapia de doenças com sintomas semelhantes. No entanto, até o momento nenhum medicamento eficaz que controle a doença foi disponibilizado. Portanto, a busca contínua por vacinas e medicamentos é crucial para combater a pandemia. Atualmente, diversos ensaios clínicos vêm sendo realizados a fim de avaliar diferentes opções terapêuticas.

Medicamentos incluindo Hidroxicloroquina, Remdesivir, Cloroquina, Ritonavir, Lopinavi, Arbidol e Interferon estão em ensaios clínicos randomizados (RCTs) para a avaliação de sua segurança e eficácia em pacientes com COVID-19 (Huang et al., 2020; Ghost AK, 2020).



O Remdesivir (GS-5734) é um pró-fármaco de fosforamidato análogo de nucleotídeo antiviral desenvolvido pela empresa farmacêutica americana “Gilead Sciences”. Tal composto foi usado no tratamento de infecções pelo vírus Ebola durante o surto na África. O Remdesivir está entre as drogas em investigação que mostra efeito promissor contra a COVID-19, possivelmente devido à sua ação antiviral de amplo espectro, incluindo alguns vírus de RNA (Beisel et al., 2020; Cao et al., 2020).

O pró-fármaco Remdesivir é um análogo do nucleotídeo adenosina substituído (ATP) 1-ciano e é metabolizado em células-alvo em um trifosfato de nucleosídeo ativo (RDV-TP) semelhante ao ATP que inibe as enzimas RNA polimerases dependentes de RNA viral (RdRp), limitando a produção de RNA viral no estágio inicial da infecção (Agostini et al., 2020; Barlow et al., 2020). Outros possíveis mecanismos de ação do Remdesivir podem ser a mutagênese e a terminação da cadeia da transcrição do RNA. Sendo que também foi descoberto, a partir de um estudo *in vitro*, que o amálgama de Remdesivir nos estágios iniciais de replicação do vírus teve ação mais eficaz dependente do tempo (Figura 2) (Barlow et al., 2020).



**Figura 2.** Mecanismo de ação do Remdesivir. Fonte: Rios et al., 2020. **Legenda:** Ativação intracelular do Remdesivir (GS-5734) e inibição da replicação do Coronavírus. A) Célula hospedeira sem o Remdesivir. B) A passagem através da membrana celular pelo Remdesivir é facilitada pelo componente pró-fármaco ligado ao núcleo do nucleosídeo. Ao entrar na célula alvo, o pronucleotídeo passa por outras etapas de fosforilação para se tornar o metabólito trifosfato ativo, que efetivamente inibe a replicação do RNA viral. O retardo da terminação da cadeia é causado pelos seguintes processos: (I) má integração do nucleosídeo trifosfato (NTP) em replicação do RNA por RdRp, (II) prevenção de maior alongamento da cadeia após NTP mais 3 nucleosídeos adicionais e (III) término prematuro da síntese de RNA.



Pesquisas clínicas geralmente são classificadas em 4 fases. Quando se analisa clinicamente um fármaco, este deve ter sido aprovado em testes pré-clínicos, ou seja, aspectos de segurança são avaliados em experimentos com animais modelo antes da aplicação do fármaco em seres humanos (WHO, 2020).

A Fase I refere-se ao uso do medicamento pela primeira vez em seres humanos, geralmente em indivíduos saudáveis e que não possuem a doença para qual o medicamento está sendo estudado, com objetivo de testar a segurança (WHO, 2020).

Na Fase II são necessários cerca de 100 a 300 indivíduos que já apresentam a doença ou condição para a qual o fármaco está sendo estudado, cujo objetivo é obter mais dados acerca da segurança em pacientes acometidos pela doença, além de dar início a avaliação da eficácia do novo fármaco (WHO, 2020).

Depois de concluído o estudo piloto, inicia-se na Fase III grandes experimentos e estudos multicêntricos, no qual milhares de pacientes são acompanhados, em média de 5 à 10 mil, em um período maior de tempo, usualmente sendo comparados a outros fármacos já existentes e recomendados para o problema em questão. O objetivo dos testes é fornecer todas as informações necessárias para a elaboração das especificações contidas no rótulo e na bula do medicamento. Para aprovação e registro do novo fármaco, esses resultados de Fase III serão avaliados pelos órgãos competentes e assim começar a Fase IV (WHO, 2020).

Após a admissão pelas agências sanitárias, logo o fármaco é disponibilizado no mercado onde são realizados monitoramentos constantes sobre o pela população. Nessa etapa, denominada de Fase IV ou Farmacovigilância, o objetivo é definir efeitos possíveis efeitos adversos não relatados ou inconclusivos, bem como fatores de riscos, e assim depreender sobre a segurança e eficácia do medicamento (WHO, 2020).

Contudo, a urgência na saúde pública, na situação atual e na complexidade dos processos de pesquisa e acesso à uma população de um medicamento, ressalta-se a importância de análises de potenciais e eficácias de drogas promissoras contra COVID-19. Dado o exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do Remdesivir em pacientes com COVID-19 por meio de uma revisão sistemática.

## MÉTODOS

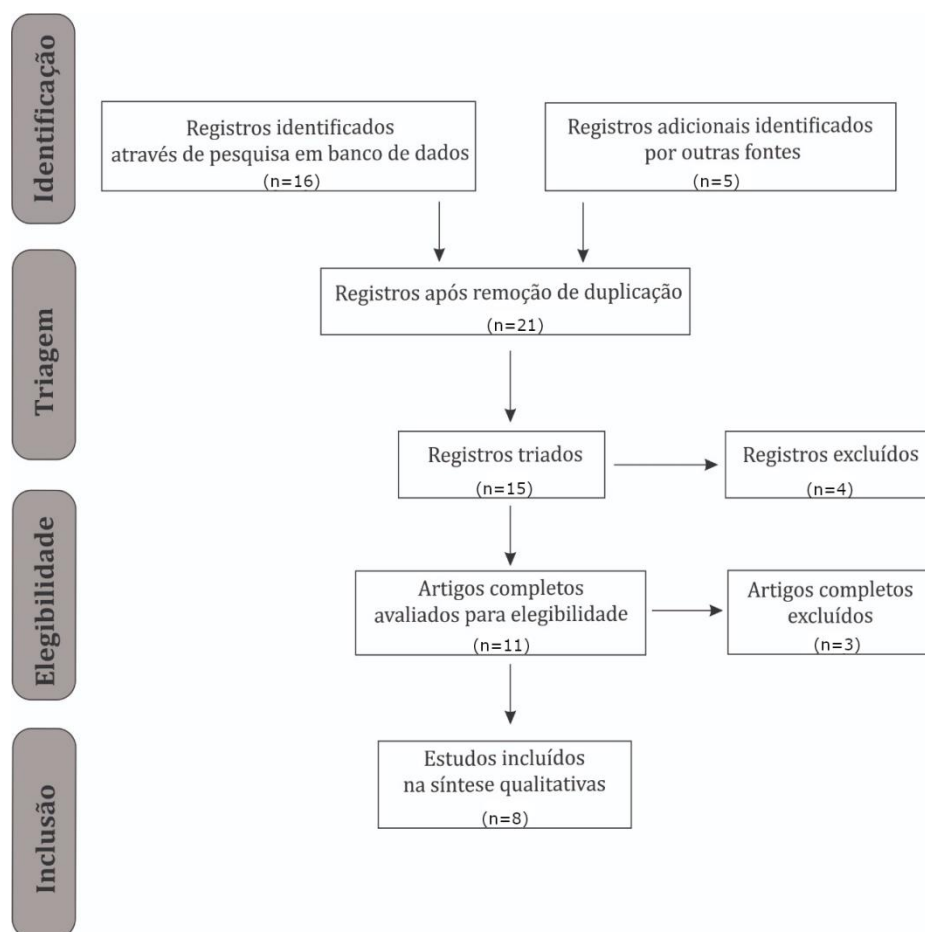
Realizamos uma revisão sistemática usando bancos de dados online como PUBMED (busca de livre acesso à base de dados MEDLINE), Embase (banco de dados bibliográfico biomédico e farmacológico da literatura publicada), Clinicaltrials.gov, ScienceDirect e Google Scholar. As pesquisas incluíram combinações de termos MeSH (Medical Subject Headings) que descrevem “COVID-19”, “tratamento”, como “SARS- cov-2”, “agentes antivirais”, “Remdesivir”, “análogo de nucleotídeo”,

“controlado randomizado ensaios” e “GS-5734”. Os dados foram coletados a partir de estudos realizados durante os anos de 2019 a 2020 (Figura 3).

Os critérios de inclusão deste estudo foram os seguintes: (a) A população do estudo inclui pacientes COVID-19 confirmado; (b) A população do estudo inclui pacientes de ambos os gêneros; (c) Em qualquer estágio clínico da doença, portanto, caso leve, moderado ou grave/crítico; (d) Uso de Remdesivir em qualquer dose; (e) Artigos originais e de revisão foram publicados em revistas revisadas por pares.

Os artigos de pesquisa selecionados e incluídos no presente estudo foram avaliados criticamente para avaliar a validade da pesquisa em relação à erros e limitações para reduzir possíveis vieses de acordo com as seguintes questões: (a) Quais são os objetivos da pesquisa e o desenho do estudo evidentemente declarados?; (b) A pesquisa é original?; (c) Os artigos de pesquisa apresentam novas descobertas?; (d) A questão da pesquisa cobre o grupo ou população de pacientes, intervenção ou terapia e a importância do resultado da pesquisa?; (e) Os pesquisadores usam metodologia e relatórios adequados?; (f) A hipótese do estudo foi devidamente abordada?; (g) Os dados e análises são precisos e os autores tiram as conclusões apropriadas com base nos resultados?; (h) O resultado do estudo é útil para a prática clínica?; (i) O risco de um diagnóstico ou tratamento prevalece sobre os benefícios potenciais?; (j) A análise dos dados é precisa?; (k) Quais níveis de incerteza envolvem quaisquer resultados?

Como limitações, podem-se incluir: (a) pesquisas online apenas por artigos escritos em inglês (não incluímos artigos escritos em outros idiomas); (b) procura por artigos apenas nas plataformas de busca, PUBMED, Clinicaltrials.gov, ScienceDirect e Google Scholar.



**Figura 3.** Diagrama do fluxo de revisão sistemática. Fonte: Rios et al., 2020. **Legenda:** *Workflow* metodológico da busca, análise e curadoria dos trabalhos relacionados a COVID-19 e Remdesivir. A cada etapa, foram selecionados apenas os trabalhos que cumpriam os requisitos necessários para passar para a próxima etapa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente, há vários casos de uso do Remdesivir relacionados ao sucesso no tratamento da COVID-19. *The New England Journal of Medicine* relatou todo o curso de recuperação do primeiro paciente com COVID-19 nos Estados Unidos. O paciente visitou Wuhan, mas não foi exposto diretamente ao mercado *Wuhan Seafood Market* (hipótese principal do marco zero da doença), nem teve contato direto com os pacientes diagnosticados. Ele retornou a Washington em 15 de janeiro de 2020. Em 19 de janeiro, devido a tosse e febre por quatro dias, foi ao hospital para tratamento de emergência, sendo então diagnosticado com COVID-19. Sua condição permaneceu estável do segundo ao quinto dia de internação (do sexto ao nono dia do início dos sintomas). Na noite do quinto dia de internação, a saturação de oxigênio no sangue diminuiu para 90%. O quadro continuou a piorar e as radiografias de tórax no sexto dia da internação mostraram características típicas de COVID-19. Com o agravamento contínuo dos sintomas clínicos do paciente, os médicos responsáveis iniciaram o tratamento com Remdesivir na noite do 6º dia de internação e começaram a aplicar o fármaco por via intravenosa na noite do sétimo dia. Não

foram apresentadas reações adversas. No oitavo dia de internação, os sintomas clínicos do paciente melhoraram e a saturação de oxigênio aumentou para 94%. Embora o paciente ainda estivesse hospitalizado em 30 de janeiro de 2020, este estava assintomático, exceto por leve tosse e corrimento nasal ocasional (Kim et al., 2020).

É importante notar que a partir dos dados de Kim J et al. (2020), foi verificado que a carga viral do paciente diminuiu antes da injeção de Remdesivir, o que não é descrito em detalhes no relatório original (Quadro 1). Sabe-se que a infecção viral é autolimitada, e o paciente em questão é um caso de infecção de leve a moderado, com febre controlada. Portanto, é possível que sua recuperação esteja relacionada aos mecanismos de autodefesa inatos e o tratamento tenha dado apenas suporte. Não se pode inferir com precisão que a melhora do estado do paciente após a ingestão do medicamento esteja definitivamente ligada ao tratamento com Remdesivir. Os sintomas clínicos, principalmente respiratórios, melhoraram significativamente em 24 horas, trazendo potencial benefício para o tratamento de pacientes com COVID-19 grave. Para COVID-19, nenhum medicamento específico está disponível até o momento e espera-se que o Remdesivir seja um “medicamento específico”. Para as doenças infecciosas agudas, reduzir o número de cópias virais no corpo é o ponto chave, além disso, a eficácia do medicamento deve ser focada nos dados de farmacocinética e cinética de COVID-19, em estudos clínicos de Fase III em andamento (Kim et al., 2020).

**Quadro 1.** Carga viral no primeiro caso de recuperação de paciente com COVID-19 nos Estados Unidos. Fonte: Rios et al., 2021, adaptado de Wang Y et al., 2020.

	4º dia do início dos sintomas	7º dia do início dos sintomas	11º dia do início dos sintomas
<b>Cotonete nasofaríngeo</b>	Ct*, 18-20	Ct, 23-24	Ct, 33-34
<b>Cotonete orofaríngeo</b>	Ct, 21-22	Ct, 32-33	Ct, 36-40

\* Ct mais alto significa carga viral mais baixa.

Apesar de haver vários casos de sucesso no tratamento da COVID-19 com o Remdesivir, até o momento existem poucos estudos clínicos referentes ao efeito do fármaco no tratamento da doença. Neste trabalho foram selecionados 16 estudos após busca online, porém apenas 8 estudos foram considerados elegíveis para o estudo do uso de Remdesivir no tratamento de COVID-19, por serem estudos que cumpriram com os pré-requisitos metodológicos. Os dados existentes sobre o uso de Remdesivir estão disponíveis principalmente em cultura de células humanas *in vitro*, estudos *in vivo* em camundongos e primatas não humanos (Quadro 2).

**Quadro 2.** Características dos estudos que relacionaram o efeito de Remdesivir na COVID-19. Fonte: Rios et al., 2020.

Autor	Amostras Tamanho / linha celular	Tipo de estudo	Resultados
Beigel JH et al., 2020	538	Ensaio hospitalar, randomizado, controlado por placebo e Remdesivir intravenoso.	Avaliaram o tratamento da COVID-19 com Remdesivir em comparação com o placebo. A partir da observação inicial, eles descobriram que o Remdesivir foi melhor do que o placebo na redução do tempo de recuperação em pacientes adultos hospitalizados com COVID-19 e o estudo também confirmou a menor infecção do trato respiratório devido ao tratamento com Remdesivir
Wang Y et al., 2020	158	Ensaio multicêntrico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo.	Foi observado que, no caso de pacientes adultos com COVID-19, o tratamento com Remdesivir não estava significativamente associado à benefícios clínicos. No entanto, o estudo também evidenciou redução no tempo para melhora clínica naqueles tratados anteriormente com Remdesivir.
Wang M et al., 2020	Linhagem de células Huh7 de câncer de fígado humano.	<i>In vitro</i>	Remdesivir inibiu a infecção pelo vírus da COVID-19 de forma eficiente na linha celular humana (Huh-7), que é sensível ao SARS-CoV-2.
Kujawski as et al., 2020	3	Ensaio de Remdesivir intravenoso.	Uma vez que o medicamento Remdesivir não foi administrado como parte de um ensaio clínico randomizado (RCT), o estudo foi incapaz de avaliar a eficácia ou segurança do Remdesivir
Gordon CJ et al., 2020	Células de inseto (Sf9).	<i>In Vitro</i>	O estudo forneceu evidências da ação específica ao alvo do Remdesivir, uma vez que o RDV-TP foi integrado de forma menos eficiente pelo vírus Lassa relacionado à distância, RdRp, enquanto a terminação da síntese de RNA não foi encontrada. O estudo fornece um novo mecanismo unificador desenvolvido de inibição da síntese de RNA mediada por RDV no SARS-CoV-2 e identifica o Remdesivir como um antiviral de ação direta.
Cao YC et al., 2020	-	Revisão	O estudo demonstrou estrutura, imunogenicidade e patogênese do SARS-CoV-2. Além disso, eles analisaram as ações farmacológicas do Remdesivir para

<b>Huang C et al., 2020</b>	-	Revisão	reconhecer a viabilidade de conduzir pesquisas com Remdesivir e COVID-19. Discutiu o desenvolvimento de inibidores de RNA polimerases dependentes de RNA (RdRp) eficazes e prósperos.
<b>Barlow A et al., 2020</b>	-	Revisão	É discutido o modo de ação e efeitos colaterais do Remdesivir

Dos 8 estudos elegíveis, apenas 2 eram ensaios clínicos randomizados controlados com placebo e com administração de Remdesivir intravenosa; 2 estudos *in vitro* sobre Remdesivir e COVID-19; 3 revisões de artigos relevantes e apenas um ensaio de Remdesivir intravenoso não considerado ensaio controlado randomizado durante o estudo. Para considerações práticas do tratamento antiviral com Remdesivir contra COVID-19, foi proposto padrão conforme o Quadro 3.

**Quadro 3.** Considerações práticas do tratamento antiviral com Remdesivir proposto contra COVID-19. Fonte: Rios et al., 2020; adaptado de Beigel et al., 2020.

Natureza	Dose	Administração	Interação do Fármaco	Efeitos colaterais
Análogo de nucleotídeo (GS-5734), contém $\beta$ -ciclodextrina, C27H35N6O8P (fórmula molecular), 602,6g / mol (peso molecular)	200 mg por via intravenosa seguida de 100 mg / dia por via intravenosa por 5-10 dias (ClinicalTrials, 2020)	30 minutos	Remdesivir é metabolizado ativo, um nucleosídeo trifosforilado, via quinase intracelular anabólica e termina a produção de RNA viral nas fases iniciais da infecção.	Vômito, náusea, gastroparesia ou sangramento retal

Wang e colaboradores (2020), conduziram um estudo *in vitro* sobre Remdesivir e descobriram que este possui eficácia em inibir a replicação do SARS-CoV-2, sendo que conduziram o estudo usando células humanas Huh7. Embora na Fase II o Remdesivir não tenha sido tão eficiente quanto outros medicamentos concorrentes, este mostrou boa segurança e farmacocinética. Os ensaios clínicos de Fase III do Remdesivir em pacientes com COVID-19 estão em andamento. Espera-se que o resultado do estudo de Fase III façam com que o Remdesivir volte como medicamento antiviral comprovado (Tay et al., 2020).

Wang Y et al. (2020) publicaram o primeiro ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo avaliando o efeito do Remdesivir intravenoso entre adultos hospitalizados positivos para COVID-19. Estes relataram que nos pacientes tratados, a diferença do avanço clínico da doença não foi

significativa entre os grupos tratados com Remdesivir; no entanto, foi observada melhora clínica no grupo tratado com Remdesivir em comparação com o grupo controle, principalmente nos pacientes tratados dentro de 10 dias do início dos sintomas. Para o estudo, foi interpretado que, no caso de pacientes adultos com COVID-19, o tratamento com Remdesivir não estava significativamente associado à benefícios clínicos. Contudo, o estudo também evidenciou redução no tempo para melhora clínica naqueles tratados anteriormente com Remdesivir.

Beigel ML et al. (2020) conduziram uma série de ensaios de Fase III, randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo para avaliar a eficácia clínica e a segurança de Remdesivir em adultos internados em hospital com COVID-19. Nesse estudo, eles avaliaram o tratamento de COVID-19 com Remdesivir em comparação com placebo. A partir da observação inicial, eles descobriram que o Remdesivir foi melhor do que o placebo na redução do tempo de recuperação dos pacientes. Além disto, foi confirmada uma menor infecção do trato respiratório devido ao tratamento com Remdesivir. Entretanto, este trabalho requer confirmação em estudos populacionais maiores (Agostini JH et al., 2018).

Remdesivir é ativo *in vitro* contra vários Coronavírus (CoVs), incluindo SARS-CoV-2, e seu mecanismo de ação foi estudado extensivamente (Wang et al., 2020; Ogando et al., 2020; Choy et al., 2020; Us Food and Drug Administration, 2020). Estudos em animais que incluíram modelos de primatas não humanos de MERS-CoV e, recentemente, SARS-CoV-2 apoiam sua eficácia, especialmente quando administrado no início da doença (Wit et al., 2020; Williamson et al., 2020). Finalmente, um ensaio de Fase III mostrou efeitos clínicos benéficos do Remdesivir em pacientes que requerem oxigênio suplementar, enquanto a eficácia clínica para pacientes criticamente enfermos que requerem ventilação mecânica não pôde ser demonstrada (Beigel et al., 2020). Remdesivir reduz o tempo de recuperação em 31%, o que é um efeito relativamente modesto, mas claramente terapêutico (Beigel et al., 2020).

Além desses efeitos benéficos para os pacientes, o tratamento pode ajudar a reduzir o número de dias de internação, com efeitos positivos sobre os custos e problemas de capacidade hospitalares que surgiram durante a pandemia de COVID-19 em vários países. No que diz respeito à mortalidade, uma menor taxa de mortalidade em 14 dias de pacientes tratados com Remdesivir foi relatada no estudo ACTT (*Adaptive Covid-19 Treatment Trial*), o que pode indicar um efeito benéfico, mas não estatisticamente significativo (Beigel et al., 2020). Levando em consideração que o estudo não possuía capacidade para avaliar a mortalidade, este ainda é um sinal positivo que deve ser avaliado em estudos de grande porte.

Em estudo com meta-análise de dados agrupados, dois ensaios clínicos randomizados controlados disponíveis, e que ainda estão em revisão por pares, conclui uma redução estatisticamente significativa na mortalidade (Razão de Risco (RR), 0,69; 95% de Intervalo de Confiança (IC), 0,49 a 0,99) (Alexander et al., 2020) Embora os dados clínicos sobre o Remdesivir ainda não tenham sido totalmente publicados, as autorizações de emergência e a aprovação recente da EMA são encorajadoras, visto que a maioria dos



outros medicamentos em investigação falhou até agora, deixando o Remdesivir como o único antiviral com eficácia clinicamente comprovada contra COVID-19 até o momento. Os resultados completos do estudo ACTT, incluindo os impactos nas cargas virais e na mortalidade no dia 28, bem como os resultados dos ensaios e meta-análises em andamento, fornecerão mais informações sobre a eficácia clínica do Remdesivir (Cao et al., 2020; Borba et al., 2020).

A eficácia terapêutica do Remdesivir pode ainda ser melhorada pela adição de outros antivirais ou agentes imunomoduladores. Recentemente, foi demonstrado que os glicocorticóides são capazes de melhorar os resultados clínicos em casos de COVID-19 grave e crítico (RECOVERY, 2020). Com base nesses dados, pode-se esperar que os médicos usem Remdesivir e glicocorticoides para tratar pacientes com COVID-19 em estado grave ou crítico. No entanto, a terapia combinada deve ser usada com cautela, pois podem ocorrer interações medicamentosas.

*In vitro*, o Remdesivir atua como substrato ou inibidor de várias enzimas metabolizadoras de medicamentos (por exemplo, CYP3A4), o que pode influenciar os níveis de exposição de outros agentes terapêuticos. Além disso, esses agentes podem interferir na farmacocinética do Remdesivir. A droga imunomoduladora hidroxicloroquina, por exemplo, parece reduzir a atividade antiviral do Remdesivir ao prejudicar sua ativação metabólica intracelular. Outra abordagem que pode melhorar os resultados clínicos poderia ser a terapia combinada com drogas antivirais diretas que visam vários processos dentro do ciclo de vida viral. Embora essa estratégia seja altamente eficaz na terapia de infecções crônicas com HIV e HCV, não está claro se isso é verdade para infecções agudas com SARS-CoV-2. Os ensaios clínicos avaliando a terapia combinada são necessários para estimar seu papel no COVID-19 (Us Food and Drug Administration, 2020).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Remdesivir é um inibidor da replicação de RNA viral e foi efetivamente usado contra vírus de RNA como o SARS-CoV e o MERS-CoV. Recentemente o fármaco foi testado contra infecções por SARS-Cov-2, inicialmente em células *in vitro* e não humanas. O Remdesivir apresentou resultados terapêuticos promissores para o controle do COVID-19. Apesar dos dados de eficácia do medicamento em pacientes positivos para COVID-19 nos ensaios clínicos de Fase III ainda serem escassos, recentemente, foram relatados resultados de dois estudos de Fase III randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo em hospitais. Ambos os estudos mostraram eficácia de Remdesivir em pacientes positivos para COVID-19. No entanto, verificaram que o tratamento com Remdesivir não foi significativamente associado à benefícios clínicos. Em conclusão, esta é a primeira revisão sistemática sobre o efeito do Remdesivir no tratamento do COVID-19, sendo que a partir desta, sugerimos que é promissor o uso do Remdesivir para tratar pacientes positivos, potencializando seu efeito quando



combinado com outros fármacos, como os glicocorticóides. Por fim, é necessário que futuros estudos clínicos, com maior número de pacientes, sejam considerados para atestar a eficácia e segurança do Remdesivir no tratamento da COVID-19.


## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostini ML et al. (2018). Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease. *mBio*, 9(2): 00221-18.
- Alexander PE et al. (2020). Remdesivir use in patients with coronavirus COVID-19 disease: a systematic review and meta-analysis. *medRxiv*, 2020.05.23.20110932.
- Barlow A et al (2020). Review of emerging pharmacotherapy for the treatment of coronavirus disease 2019. *Pharmacotherapy*, 40(5): 416-437.
- Beigel JH et al. (2020). Remdesivir for the treatment of COVID-19 - Preliminary Report. *N Engl J Med*, 383: 1813-1826.
- Borba MGS et al. (2020). Effect of high vs low doses of chloroquine diphosphate as adjunctive therapy for patients hospitalized with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection: a randomized clinical trial. *JAMA Netw Open*, 3:208857.
- Cao YC et al. (2020). Remdesivir for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 causing COVID-19: An evaluation of the evidence. *Travel Med Infect Dis*, 35: 101647.
- Cao B et al. (2020). A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N Engl J Med*, 382: 1787-1799.
- Chan JF et al. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*, 9(1): 221-236.
- Choy KT, et al. (2020). Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Res*, 178:104786.
- Clinicaltrials.gov. (2020). A Trial of Remdesivir in Adults With Severe COVID-19, *clinicalTrials.gov* identifier (NCT number): NCT04257656.
- Feng W et al. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a review. *Mol Cancer*, 19(1): 100.
- Ghosh AK et al (2020). Drug development and medicinal chemistry efforts toward SARS-Coronavirus and COVID-19 therapeutics. *ChemMedChem*, 15(11): 907-932.
- Gordon CJ et al (2020). Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *J Biol Chem*, 295(20): 6785-6797.

- Huang C et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223): 497-506.
- Huang J et al. (2020). Pharmacological Therapeutics Targeting RNA-Dependent RNA Polymerase, Proteinase and Spike Protein: From Mechanistic Studies to Clinical Trials for COVID-19: *J Clin Med*, 9(4): 1131.
- Kim J et al. (2020). The First Case of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia Imported into Korea from Wuhan, China: Implication for Infection Prevention and Control Measures. *J Korean Med Sci*, 35(5): 61.
- Kujawski SA et al. (2020). First 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *medRxiv*, 2020.03.09.20032896
- Kwong KC et al. (2020). COVID-19, SARS and MERS: A neurological perspective. *J Clin Neurosci*, 77: 13-16
- Ogando NS et al. (2020). SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J Gen Virol*, 101(9):925-940.
- Recovery Collaborative Group et al. (2020). Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19—preliminary report. *New England Journal of Medicine*, NEJMoa2021436
- Tang D et al. (2020). The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog*, 16(5): e1008536.
- Tay MZ et al. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20: 363-374.
- Tu H et al. (2020). Current epidemiological and clinical features of COVID-19; a global perspective from China. *J Infect*, 81(1): 1-9.
- U.S. Food and Drug Administration (2020). Fact Sheet for health care providers: emergency use authorization (EUA) of Veklury (remdesivir). US Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, <https://www.fda.gov/media/143189/download>
- Wang C et al. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*, 395(10223): 470-473
- Wang M et al. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*, 30: 269-271.
- Wang Y et al. (2020). Remdesivir in Adults With Severe COVID-19: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Trial. *Lancet*, 395(10236): 1569-1578.
- World Health Organization (2020). Coronavirus disease (COVID-19), Situation Report – 150. WHO National Authorities. Acesso: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200618-covid-19-sitrep-150.pdf?sfvrsn=aa9fe9cf\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200618-covid-19-sitrep-150.pdf?sfvrsn=aa9fe9cf_4)
- Williamson BN et al. (2020). Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *Nature*, 585: 273-276.


- Wit E de et al. (2020). Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. PNAS, 117(12): 6771-6776
- Wrapp D et al. (2020). Cryo- EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science, 367(6483): 1260-1263.


## O metatranscriptoma em alimentos: o impacto estatístico da expressão gênica do microbioma na saúde humana

 10.46420/9786588319543cap4


Diego Lisboa Rios<sup>1\*</sup> 


Silvia de Siqueira Costa<sup>2</sup> 

Thiago Araújo Andrade<sup>3</sup> 

Paula Margarita Salazar Torres<sup>4</sup> 

Lucas Roberto da Silva<sup>5</sup> 

Pedro Gontijo Carneiro<sup>6</sup> 

Kerley dos Santos Alves<sup>7</sup> 

Wellington Ribeiro Aquino Marques<sup>8</sup> 

João Batista Matos Júnior<sup>9</sup> 

Fabyola Antunes Gonçalves Souza<sup>10</sup> 

### INTRODUÇÃO

O estudo da ecologia microbiana dos alimentos é relevante para a indústria biotecnológica, pois é a base não apenas para o desenvolvimento de processos de fermentações, mas também para a compreensão das interações microbianas que conduzem a um processo de qualidade superior. A relação entre os alimentos e seu microbioma é fundamental para sua qualidade e segurança. Comunidades microbianas benéficas podem ser responsáveis por características reológicas e organolépticas dos alimentos fermentados. No entanto, microrganismos indesejáveis também podem estar presentes e seu crescimento pode afetar a qualidade dos alimentos, levando a deterioração ou outros problemas de segurança alimentar, impactando a saúde do consumidor. Tradicionalmente, a identificação da microbiologia nos alimentos depende de técnicas baseadas no cultivo dos microrganismos. No entanto, além de sua baixa sensibilidade, essas técnicas podem exigir fatores e condições de crescimento

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>2</sup> Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Divinópolis - MG.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>4</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>5</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>6</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>7</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>8</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>9</sup> Instituto Federal do Acre (IFAC), Rio Branco - AC.

<sup>10</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

\* Autor(a) correspondente: lisboa.zootec@gmail.com

desconhecidos presentes em habitats naturais, mas que não são fáceis de reproduzir em meios de cultura laboratoriais. Tais limitações podem levar a uma subestimação da diversidade microbiana (Du et al., 2020).

Nas últimas décadas, houve avanços significativos nas tecnologias de sequenciamento que transformaram a condução de experimentos biológicos, particularmente em estudos de comunidades microbianas complexas. Técnicas independentes de cultivo ajudaram a mudar a maneira de estudar a ecologia microbiana dos alimentos, levando a considerar as populações microbianas como consórcios (Kim et al., 2020). A evolução adicional foi estimulada pelo advento das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (HTS) que, em meados dos anos 2000, se tornaram onipresentes nos estudos de ecologia microbiana. O uso da HTS implica na maior sensibilidade em comparação com os métodos tradicionais independentes de cultivo, além de ser um método quantitativo preciso.

A maior parte do HTS se concentrou no sequenciamento de DNA de comunidades inteiras, usando abordagens direcionadas, como sequenciamento de PCR-amplicon do gene 16S rRNA (ou outros genes marcadores) ou sequenciamento *shotgun* de todo o DNA disponível na amostra (metagenoma). Pesquisadores quantificaram a expressão gênica com o uso de RNAs por muito tempo, através de abordagens direcionadas, como RTqPCR. Ainda, antes do advento do sequenciamento de alto rendimento, as tecnologias de microarray também eram amplamente utilizadas para medir os níveis de expressão de transcritos conhecidos de organismos ou mesmo comunidades microbianas (Pangallo et al., 2019). Pelas diversas aplicações das tecnologias de Sequenciamento de nova geração (NGS) do RNA, agora é possível não apenas medir alvos de transcrição conhecidos, mas também descobrir transcritos e variantes de transcrição desconhecidas anteriormente através do metatranscriptoma.

Num curto espaço de tempo desde que foi introduzido pela primeira vez no início dos anos 2000, o número de projetos de metatranscriptômica aumentou significativamente. Em termos de aplicações, a técnica tem sido usada para caracterizar microrganismos ativos em uma comunidade (Dugat-Bony et al., 2019), descobrir novas interações microbianas (Ali et al., 2019), detectar RNA antisense regulatório (Yi et al., 2019) e rastrear a expressão de genes, bem como determinar a relação entre vírus e seu hospedeiro (Huang et al., 2017). Apesar das diversas vantagens em se utilizar esse método, algumas desvantagens são observadas na maioria dos métodos metatranscriptômicos. O projeto experimental é crítico, a coleta de amostras é destrutiva, e é necessário material suficiente para o sequenciamento (ou experimentos robustos). Além disso, a metatranscriptômica nem sempre é capaz de capturar todo o metatranscriptoma devido em parte à complexidade (alta diversidade e proporções relativas de membros) de algumas comunidades microbianas, à grande faixa dinâmica de expressão da transcrição, à curta meia-vida do RNA e várias limitações específicas da tecnologia. No entanto, o conhecimento da expressão de microrganismos presentes nos alimentos tem impacto direto na saúde humana, uma vez que tais organismos produzem

metabólitos, benéficos ou não, podendo ainda habitar o trato gastrointestinal de forma permanente (adesão ao lúmen) ou transitória (Mataragas, 2020).

Nesta revisão relatamos o estado da arte em metatranscriptômica, discutindo todos os estudos em alimentos disponíveis até então, e seus impactos na saúde humana.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Aplicação de metatranscriptômica em produtos fermentados*

A metatranscriptômica tem sido aplicada a vários tipos diferentes de amostras, como ambientes aquáticos, ambientes terrestres, microrganismos humanos, interações adicionais entre animais e microrganismos, interações planta-microrganismo (Pangallo et al., 2019). Nesta seção, relatamos a metatranscriptômica na microbiologia de alimentos e seu impacto na saúde humana.

Mesmo sendo uma tecnologia nova, hoje existem 1.357 resultados para a pesquisa usando o termo “metatranscriptome” no site de buscas NCBI PUB MED. Apesar disto, existem apenas 36 resultados para pesquisa deste termo relacionado a alimentos.

### *A metatranscriptoma aplicado à carne*

A carne é considerada um excelente meio de cultura para os microrganismos devido a sua composição nutricional ideal para o crescimento de bactérias deteriorantes e organismos patogênicos (Höll et al., 2020). A avaliação do microbioma dos alimentos é um dos parâmetros mais importantes para se determinar a qualidade e a sanidade dos alimentos. Quando o crescimento microbiano não é controlado adequadamente, pode favorecer microrganismos contaminantes e potencialmente patogênicos, originários do próprio animal ou de fontes externas durante sua manipulação, armazenamento e transporte, causando prejuízos à saúde do consumidor (Duan et al., 2016).

Höll e colaboradores (2019) de forma pioneira, compararam a microbiota do peito de frango sem pele por metatranscriptoma em diferentes atmósferas contendo CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (30/70%) e CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (30/70%), sendo encontradas grandes quantidades de transcritos mapeados para *Photobacterium* spp. que eram alterados dependendo da atmosfera. Em contrapartida, com o metagenoma se manteve estável. Em trabalho subsequente, observaram distintas rotas metabólicas expressas *in situ* por *Brochothrix thermosphacta* e *Carnobacterium* spp. quando comparada a microbiota da carne de aves capoeiras por análise metatranscriptômica nas diferentes atmosferas (Höll et al., 2020).

Duan e colaboradores (2016) investigaram o estágio de formação de sabor durante a fermentação do molho de camarão. Os autores verificaram que o gênero *Tetragenococcus* dominou (95,1%) a amostra analisada, sendo a espécie *Tetragenococcus halophilus* identificada como responsável por 520 dos 588

transcritos anotados no banco de dados NR. A ativação do ciclo do citrato e fosforilação oxidativa, juntamente com a ausência de expressão gênica da lactato desidrogenase, em *T. halophilus* sugere que provavelmente este sofreu metabolismo aeróbico durante a fermentação do milho de camarão.

### ***Metatranscriptoma aplicado à bebidas fermentadas no leite***

Os produtos lácteos fermentados estão há muito tempo associados à capacidade de conferir benefícios à saúde daqueles que os consomem regularmente devido seu impacto positivo na microbiota intestinal, o que contribui para a saúde e longevidade (Metchnikoff, 1908). Os benefícios à saúde humana estão associados a presença de bactérias benéficas, chamadas atualmente de probióticos, que podem ser encontradas em produtos lácteos como iogurte, queijos, koumiss e kefir, são consumidos há milhares de anos (Du et al., 2020). Conhecer o ecossistema da fermentação é vital para entender quais microrganismos e vias metabólicas são mais impactantes na qualidade, sabor, consistência e potencial probiótico dos produtos fermentados do leite.

McNulty e colaboradores (2011) verificaram que o impacto do consórcio de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus thermophilus* no leite fermentado era mínimo quando analisada a composição do metagenoma da microbiota intestinal de camundongos. No entanto, observaram grandes mudanças quando analisaram o RNA-Seq, indicando alterações significativas na expressão de enzimas codificadas pelo microbioma e envolvidas em inúmeras vias metabólicas, com destaque àquelas relacionadas ao metabolismo de carboidratos. Outro estudo analisou a expressão gênica na produção de biofilmes em camundongos, identificando a ordem *Lactobacillales* como dos principais microrganismos habitantes dos biofilmes (62-82% das *reads* de rRNA), seguidos por *Clostridiales* (8-31% de *reads* rRNA). Com relação às vias metabólicas do biofilme da microbiota, foram identificados transcritos em alta abundância relacionados à produção glicose, consumo de maltose, degradação de peptídeos e transporte de aminoácidos, indicando serem as principais vias catabólicas e anabólicas (Schwab et al., 2014).

Sugahara e colaboradores (2015) observaram através do metatranscriptoma que o probiótico *Bifidobacterium longum* é capaz de alterar o metabolismo intestinal do hospedeiro através de modificação de toda a comunidade microbiana intestinal, modulando vias metabólicas específicas. Já Asnicar e colaboradores (2017) verificaram que a exposição precoce do bebê ao leite materno é importante na transmissão vertical e desenvolvimento final de um microbioma infantil saudável, reforçando a ideia de que o reservatório microbiano materno é uma via chave de transmissão de microbiota.

A digestão da caseína e outras proteínas do leite são um problema para algumas pessoas devido a deficiência no metabolismo da lactose. Em estudo de 2018, Hugenholtz e colaboradores identificaram bactérias probióticas que participam no catabolismo de proteínas não digeríveis como pertencentes às



famílias *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae* e *Clostridiaceae*, expressando ainda uma grande variedade de metabólitos, sendo predominantes os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no intestino.

### ***Metatranscriptoma aplicado ao queijo***

Queijos talvez sejam o alimento mais famoso e difundido no mundo, há evidências que restos de queijo feito a partir de kefir que datam de 1980-1450 A.C. (Yang et al., 2014). Características únicas da região de produção, como umidade, altitude, temperatura, e microrganismos iniciadores, bem como a composição do leite utilizado impactam diretamente na qualidade, sabor e propriedades probióticas dos queijos produzidos. Conhecer quais vias metabólicas e microrganismos estão relacionados à um queijo de melhor qualidade pode levar a produtos de excelência e livres de patógenos contaminantes. Sendo assim, pesquisas com metatranscriptoma são de extrema importância para o crescimento do conhecimento na área (Tabela 1).

**Tabela 1.** Pesquisa e contribuição para o estado da arte do metatranscriptoma aplicado ao queijo.

<b>Pesquisa e contribuição para o estado da arte</b>	<b>Autor</b>
Através do metatranscriptoma de queijo industrial do tipo Camembert canadense, foi analisado o metabolismo envolvido na maturação do queijo ao longo de 77 dias, que tem como principais fungos o bolor <i>Penicillium camemberti</i> e a levedura <i>Geotrichum candidum</i> . De acordo com a anotação funcional realizada, os processos predominantes durante o amadurecimento do Camembert incluem a expressão gênica das categorias C (metabolismo energético), G (metabolismo de carboidratos), E (metabolismo de aminoácidos) e I (metabolismo de lipídios) no banco de dados <i>euKaryotic Orthologous Groups</i> (KOG), que parecem participar tanto no metabolismo do bolor quanto da levedura. Além de serem os mais expressos, também podem ser considerados os mais relevantes em termos de propriedades sensoriais. Os dados de expressão relativa mostraram que essas funções ocorreram principalmente nas primeiras duas semanas do amadurecimento, sendo o período mais delicado. Foi observado ainda que o bolor, ao final do período de maturação, tem o aumento da expressão de 3-ketoacyl-coA thiolase, apontando o aumento da expressão do gene como um bom marcador para maturação ideal do queijo. Foi observado a expressão de thioesterases, decarboxilases e redutases que são responsáveis pela produção de álcoois, os quais são importantes componentes do aroma dos queijos tipo Camembert. Posteriormente, novas análises de metatranscriptômica revelaram mudanças funcionais no microbioma causadas pela temperatura, que impactam a taxa de maturação do queijo. O aumento na temperatura de amadurecimento promoveu a expressão de genes relacionados à proteólise, lipólise e catabolismo de aminoácidos/lipídios e aumentando significativamente a taxa de maturação do queijo.	(Lessard et al., 2014ab)
Investigaram a atividade de microrganismos no queijo Reblochon por análise metatranscriptômica, observando perfis de expressão diferentes nos estágios de fermentação dos queijos.	Monnet e colaboradores (2016)

Usando dados de metatranscriptômica da comunidade microbiana durante o amadurecimento do queijo Maasdam do tipo suíço mostraram que, com exceção de *Lactococcus lactis*, o metabolismo central da microbiota foi desregulado durante o amadurecimento em câmara fria, sugerindo que menos compostos aromatizantes, como acetoina e propionato foram produzidos. Em contraste, genes de *L. lactis* relacionados ao metabolismo central, incluindo a biossíntese de vitaminas e a fermentação homolática, foram reguladas durante o amadurecimento na sala fria. (Duru et al., 2018)

Com base nos dados metatranscriptômicos durante o amadurecimento do queijo Maasdam do tipo suíço nas temperaturas entre 20°C e 5°C, foi demonstrado que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* realiza fermentação ácida mista, produzindo lactato, formato, acetato, etanol e 2,3-butanodiol. A fermentação ácida mista foi mais pronunciada em altas temperaturas de maturação. Em baixas temperaturas de maturação, os genes envolvidos na fermentação ácida mista foram reprimidos enquanto a produção de lactato não foi afetada, semelhante a uma fermentação homolática. (Mataragas, 2020)

Observaram a atividade transcricional de genes relacionados à proteólise bacteriana do ácido láctico durante maturação de queijo, com ênfase em quatro genes (*prtP*, *pepX*, *pepN* e *bcaT*) responsáveis pela produção de compostos voláteis aroma-ativos a partir de proteínas do leite por bactérias ácido lácticas (BALs). O gênero *Lactococcus* foi o principal gênero do grupo das BALs associado à essa atividade metabólica, no entanto os resultados também forneceram informações sobre o papel e as propriedades dos membros do gênero *Lactobacillus*, como *L. ramhamusus*, *L. helveticus*, *L. pentosus*, *L. curvatus*, *L. parabuchneri*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. fermentum* e *L. beilongjiangensis*, cujos os genes relacionados à proteólise estavam ativos durante o amadurecimento do queijo. (Pangallo et al., 2019)

Observaram o efeito da substituição parcial de cloreto de sódio por cloreto de potássio nas características dos microrganismos, bioquímicas e sensoriais de queijos semiduros e macios. (Dugat-Bony et al., 2019)

### ***Metatranscriptoma aplicado à bebidas fermentadas***

O chá Oolong é uma bebida parcialmente fermentada tradicionalmente produzida em Taiwan. Muitos estudos demonstraram os benefícios do chá Oolong na inibição da obesidade, na redução da deposição da placa dentária, no antagonismo das respostas imunes alérgicas e no alívio dos efeitos do envelhecimento (Huang et al., 2017). Peptídeos antimicrobianos (AMPs), geralmente contendo de 12 à 100 aminoácidos são componentes cruciais do sistema imunológico inato e podem proteger o hospedeiro de várias bactérias e vírus patogênicos. Para compreender a relação entre quatro chás Oolong de Taiwan, suas comunidades bacterianas e seu possível efeito protetor, foi criado um *pipeline* em bioinformática para identificar os AMPs e seus tipos funcionais baseados em análises de metagenômica e metatranscriptômica. Os resultados da análise revelaram que o chá Oriental Beauty exibia maior diversidade entre os chás, sendo que os resultados das análises metatranscriptômicas ainda revelaram que as espécies de bactérias mais ativas em todos os tipos de chá foram *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, e *Chryseobacterium* sp. StRB126 (Huang et al., 2017).

### ***Metatranscriptoma aplicado à frutas e vegetais***

A fermentação de alimentos, apesar de associada frequentemente com leite e carne, também ocorre em outros alimentos como cereais, vegetais, frutas, chás, bebidas alcoólicas, entre outros. No entanto, como no caso do leite e da carne, a avaliação dos microrganismos é importante para se determinar a qualidade do microbioma e a ausência de patógenos (Weckx et al., 2010).

Saminathan e colaboradores (2018) usaram análise metagenômica 16S e metatranscriptômica para a investigação da atividade de bactérias na decomposição de melancias vermelhas (PI459074, Congo e SDRose) e cultivares amarelas (PI227202, PI435990 e JBush). Dados metagenômicos mostraram que as proteobactérias eram abundantes em SDRose e PI227202, enquanto as cianobactérias eram mais abundantes no Congo e PI4559074. No entanto, nos dados de metatranscriptoma o filo Proteobacteria foi a mais expressa em todas cultivares.

Na fermentação espontânea de trigo, a expressão gênica de toda a comunidade microbiana durante a atividade metabólica foi analisada, revelando que a ativação de diferentes vias metabólicas chave, bem como a capacidade de usar outros carboidratos além da glicose (por exemplo, amido e maltose) contribuiu para geração redox de compostos de equilíbrio e sabor gerado pelas LABs durante a fermentação da massa (Weckx et al., 2011).

Weckx e colaboradores (2010) compararam os resultados combinados dependente e independentes de cultura com os dados do microarray revelando o papel funcional de *Lactococcus lactis* em estágio inicial no ecossistema, e na dominância de *Pediococcus pentosaceus* na maioria das fermentações, além de *L. plantarum* e *L. fermentum*.

### ***Metatranscriptoma aplicado ao kimchi***

Kimchi são condimentos fermentados típicos da culinária da Coreia, com base em hortaliças. Nam e colaboradores (2009) analisaram sua fermentação através de metatranscriptoma das BALs revelando que as composições relativas das BALs principais permaneceram inalteradas (houve menos de 1,5% de diferença entre o valor máximo e mínimo) em análise de metagenoma. No entanto, a análise de metatranscriptoma revelou diferenças significativas na expressão gênica das principais BALs durante a fermentação (as composições relativas mudaram de 2,4% para 9,5%). Ainda foi relatado que microrganismos menos abundantes (inferiores a 5% na análise metagenômica) tiveram expressão gênica relativamente alta na fermentação do kimchi, reforçando a importância do metatranscriptoma.

Em outro trabalho, Jung e colaboradores (2013) extraíram o mRNA total de amostras de kimchi colhidas em cinco momentos durante uma fermentação de 29 dias. Os mRNA foram mapeadas contra os genomas das seis principais linhagens de BALs. Observaram que *L. mesenteroides* foi mais ativo durante o estágio inicial fermentação, enquanto a expressão gênica por *L. sakei* e *W. koreensis* foram altos durante as

fases posteriores. Entretanto, verificaram que a expressão gênica por *L. sakei* diminui rapidamente durante os 25 dias de fermentação, possivelmente causada por infecção bacteriófago de *Lactobacillus* spp.

Kim et al. (2014) identificaram com sucesso uma quantidade substancial de sequências de vírus de RNA de plantas em kimchi, colhidas em cinco momentos durante uma fermentação. Propuseram ainda que dados de metatranscriptoma podem servir como um recurso valioso para a detecção de RNA viral, e uma triagem sistemática dos ingredientes pode ajudar a impedir o uso de materiais de baixa qualidade infectados por vírus para produção de alimentos.

Em 2017, Chun e colaboradores realizaram o primeiro estudo que se propôs a investigar a genômica e características metabólicas de *L. mesenteroides* por meio de pan-genômica e análises metatranscriptômicas, a fim de fornecer informações sobre seu genoma, características metabólicas e uma melhor compreensão das fermentações kimchi por *L. mesenteroides*. Já em 2018, Jeong e colaboradores investigaram através de análise transcricional as características fermentativas de *W. koreensis* do kimchi. Identificaram que *W. koreensis* é o principal responsável pela fermentação do kimchi com a produção de vários metabólitos fermentativos durante a fermentação tardia, sendo o primeiro estudo a investigar os fatores genômicos e metabólicos característicos de *W. koreensis*.

Em análise metatranscriptômica verificaram que a expressão de *Lactobacillus sakei* estavam envolvidas no metabolismo dos carboidratos, que aumentou à medida que a fermentação do kimchi progredia, sugerindo que *L. sakei* é mais competitivo durante o estágio final da fermentação. A via de fermentação homolática foi altamente expressa e foi constante durante a fermentação do kimchi, enquanto a expressão da fermentação da via heterolática aumentou gradualmente à medida que a fermentação progrediu. L-lactato desidrogenase foi mais expressa que a d-lactato desidrogenase, sugerindo que L-lactato é o principal lactato metabolizado por *L. sakei* (Kim et al., 2020).

### ***Metatranscriptoma aplicado à fermentação alcoólica***

Até o momento, os estudos sobre a comunidade microbiana de bebidas alcoólicas utilizando a metatranscriptoma como metodologia se concentraram na produção de licor. Licor é uma bebida alcoólica doce, composta por álcool misturado com frutas, ervas, temperos, flores, sementes, raízes, cascas de árvores, cremes e uma substância doce que pode ser sacarose, mel ou glicose. Os licores não costumam ser envelhecidos por muito tempo, mas podem ficar algum tempo descansando até que atinjam o sabor ideal. O Jiang-flavor (JF) daqu é um iniciador de licor usado para a produção de JF baijiu, um licor destilado bem conhecido na China. Embora seja necessário um estágio de alta temperatura (70°C) para o qualificar, pouco se sabe sobre sua comunidade microbiana ativa e enzimas funcionais, além de seu papel na geração de precursores de sabor para o aroma de JF baijiu (Ali et al., 2019).

Em trabalho baseado em metatranscriptômica, foram identificados fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* como os membros microbianos mais ativos, e 230 enzimas ativas relacionadas a carboidratos foram identificadas como potenciais enzimas sacarificantes à 70°C. Notavelmente, a maioria das enzimas nas vias de carboidratos e energia identificadas apresentaram menores níveis de expressão à 70°C (JF) quando comparada àquelas à 62°C (Nong-flavor), indicando menores capacidades de sacarificação e fermentação em estágios de alta temperatura (Yi et al., 2019).

Efeito sinérgico foi observado na microbiota associada ao metabolismo do enxofre na fermentação espontânea de licor chinês. Análise metatranscriptômica nos dias 3 e 10 revelaram um total de 354 microorganismos metabolicamente ativos, sendo *Saccharomyces* e *Lactobacillus* identificados como essenciais para a produção de enxofre com base nas abundâncias dos transcritos dos principais genes e frequências de distribuição de 31 enzimas envolvidas no metabolismo do enxofre (Liu et al., 2017). Song e colaboradores (2019) identificaram que *Schizosaccharomyces pombe* pode reduzir o ácido acético produzido por *Baijiu Spontaneous* presente na microbiota de fermentação alcoólica. Também utilizando o licor chinês como sistema modelo, Wu e colaboradores (2017) usaram análise de metatranscriptoma para investigar o metabolismo da uréia na fermentação espontânea, na qual identificaram *Saccharomyces cerevisiae* como dominante na transcrição de genes para biossíntese e degradação de uréia. Em novo estudo, o gênero *Lactobacillus* foi identificado como o principal produtor do sabor característico no licor chinês, através do perfil quantitativo de microbioma combinado com estatística e análise multivariada (Du et al., 2020).

Huang et al. (2017), usaram o metatranscriptoma para explorar de forma abrangente os membros ativos da comunidade microbiana e os principais transcritos com funções significativas no processo de produção do iniciador de bebidas, sendo os fungos considerados os membros da comunidade mais abundantes e ativos. Relataram que melhorias na qualidade do licor se devem às descobertas de microorganismos que produzem novas enzimas ou produtos de alto valor agregado. Com base neste trabalho de metatranscriptômica, um gene da endo- $\beta$ -glucanase (*NFEg16A*), que mostrou alto nível de expressão em NF. Neste se verificou que o gene *NFEg16A* exerce importante papel na estimulação e aquisição de mais enzimas da NF. A alta termoestabilidade do gene *NFEg16A* também pode fortalecer suas aplicações potenciais na indústria de alimentos (Ali et al., 2019). Yi et al. (2018) forneceram uma maneira direta de extrair enzimas ativas de um fungo termoestável em ambiente artificial, como o iniciador de licor NF (sabor chinês Nong), sendo obtida a-amilase (gene *NFAmy13A*).

Com o objetivo de identificar microrganismos específicos relacionados à formação de precursores de carbamato de etila na fermentação em estado sólido de licor de sabor Moutai, foi feito metatranscriptoma que verificou que *Lactobacillus* spp. degradam competitivamente com leveduras a arginina através da enzima arginina desiminase, sendo a maioria das espécies de *Lactobacillus* capaz de degradar ureia. Tais resultados indicaram que o precursor da carbamato de etila (CE) nos níveis na

fermentação no estado sólido podem ser controlados usando ácido láctico bactérias e leveduras não convencionais (Du et al., 2018).

### ***Metatranscriptoma aplicado à biossegurança nos alimentos***

Apesar da importância na saúde humana, apenas um trabalho tratou da análise metatranscriptômica voltada a biossegurança e da presença e impacto de patógenos na fermentação de alimentos. Yang e colaboradores (2020) abordam uma inédita estratégia de seqüência direta de RNAs seq, multiplex RTqPCR, metatranscriptoma em Nanopore MinION para Identificação de patógenos e vias metabólicas nocivas a saúde humana em alimentos e sugere seu uso para identificação rápida e precisa de patógenos e seus metabólitos nos alimentos.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nesta revisão apresentamos estudos recentes que focaram no metatranscriptoma do microbioma de alimentos. Esses estudos são o ponto de partida para a identificação de sinais metabólicos críticos que têm o potencial de impactar na saúde humana. Esses estudos fornecem ainda uma visão sobre como as comunidades microbianas se comportam, informações que eram inimagináveis há apenas uma década. Apesar de tudo exposto, o metatranscriptoma pode vir a não representar necessariamente os produtos metabólicos finais gerados pela comunidade microbiana, podendo alguns mecanismos pós traducionais interferir no resultado final, mesmo que estes sejam raros em procariotos como as bactérias. Sugerimos que o uso do metatranscriptoma integrado com melhorias na proteômica e metabolômica devem nos permitir determinar a origem das proteínas e metabólitos produzidos pelo microbioma em diferentes condições. Por fim, sugerimos que a associação do metatranscriptoma do alimento, com o transcriptoma humano para entender como o hospedeiro interage com o microbioma seja essencial para se ter um quadro completo da saúde e dos perfis de expressão do hospedeiro com os padrões do microbioma pode ser uma das direções a seguir.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ali B et al. (2019). Characterization of a fungal thermostable endoglucanase from Chinese Nong-flavor daqu by metatranscriptomic method. *Int J Biol Macromol*, 121: 183-190.
- Asnicar F et al. (2017). Studying Vertical Microbiome Transmission from Mothers to Infants by Strain-Level Metagenomic Profiling. *mSystems*, 2(1): e00164-16.




- Chun BH et al. (2017). Pan-genomic and transcriptomic analyses of *Leuconostoc mesenteroides* provide insights into its genomic and metabolic features and roles in kimchi fermentation. *Sci Rep.*, 7(1): 11504.
- Du H et al. (2018). Ethyl Carbamate Formation Regulated by Lactic Acid Bacteria and Nonconventional Yeasts in Solid-State Fermentation of Chinese Moutai-Flavor Liquor. *J Agric Food Chem.*, 66(1): 387-392.
- Du R et al. (2020). Chinese Liquor Fermentation: Identification of Key Flavor-Producing *Lactobacillus* spp. by Quantitative Profiling with Indigenous Internal Standards. *Appl Environ Microbiol.*, 86(12): e00456-20.
- Duan S et al. (2016). Composition and Metabolic Activities of the Bacterial Community in Shrimp Sauce at the Flavor-Forming Stage of Fermentation As Revealed by Metatranscriptome and 16S rRNA Gene Sequencings. *J Agric Food Chem.*, 64(12): 2591-603.
- Dugat-Bony E et al. (2019). Effect of sodium chloride reduction or partial substitution with potassium chloride on the microbiological, biochemical and sensory characteristics of semi-hard and soft cheeses. *Food Res Int.*, 125: 108643.
- Duru IC et al. (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *Int J Food Microbiol*, 281: 10-22.
- Höll L et al. (2020). Metatranscriptomic analysis of modified atmosphere packaged poultry meat enables prediction of *Brochothrix thermosphacta* and *Carnobacterium divergens* in situ metabolism. *Arch Microbiol.*, 202: 1945–1955.
- Höll L et al. (2019). Prediction of in situ metabolism of photobacteria in modified atmosphere packaged poultry meat using metatranscriptomic data. *Microbiol Res.*, 222: 52-59.
- Huang Y et al. (2017). Metatranscriptomics Reveals the Functions and Enzyme Profiles of the Microbial Community in Chinese Nong-Flavor Liquor Starter. *Front Microbiol.*, 8: 1747.
- Huang Y et al. (2017). Metatranscriptomics Reveals the Functions and Enzyme Profiles of the Microbial Community in Chinese Nong-Flavor Liquor Starter. *Front Microbiol.*, 8: 1747.
- Hugenholtz F et al. (2018). Metatranscriptome analysis of the microbial fermentation of dietary milk proteins in the murine gut. *PLoS One*, 13(4): e0194066.
- Jeong SE et al. (2018). Genomic and metatranscriptomic analyses of *Weissella koreensis* reveal its metabolic and fermentative features during kimchi fermentation. *Food Microbiol.*, 76: 1-10.
- Jung JY et al. (2013). Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. *Int J Food Microbiol.*, 15163(2-3): 171-179.
- Kim DS et al. (2014). Plant RNA virus sequences identified in kimchi by microbial metatranscriptome analysis. *J Microbiol Biotechnol.*, 24(7): 979-86.



- Kim KH et al. (2019). Genomic and metabolic features of *Lactobacillus sakei* as revealed by its pan-genome and the metatranscriptome of kimchi fermentation. *Food Microbiol.*, 86: 103341.
- Lessard MH et al. (2014). Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics*, 15: 235.
- Liu Z et al. (2019). Metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal activity and hosts of antibiotic resistance genes in activated sludge. *Environ Int.*, 129: 208-220.
- Mataragas M (2020). Investigation of genomic characteristics and carbohydrates' metabolic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during ripening of a Swiss-type cheese. *Food Microbiol.*, 87: 103392.
- McNulty NP et al. (2011). The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med.*, 3(106): 106ra106.
- Metchnikoff E (1908). *The Prolongation of Life*. New York, NY: Putnam.
- Monnet C et al. (2016). Investigation of the Activity of the Microorganisms in a Reblochon-Style Cheese by Metatranscriptomic Analysis. *Front Microbiol.*, 7: 536.
- Nam YD et al. (2009). Metatranscriptome analysis of lactic acid bacteria during kimchi fermentation with genome-probing microarrays. *Int J Food Microbiol.*, 130(2): 140-6.
- Pangallo D et al. (2019). Transcription activity of lactic acid bacterial proteolysis-related genes during cheese maturation. *Food Microbiol.*, 82: 416-425.
- Saminathan T et al. (2018). Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses of Diverse Watermelon Cultivars Reveal the Role of Fruit Associated Microbiome in Carbohydrate Metabolism and Ripening of Mature Fruits. *Front Plant Sci.*, 9: 4.
- Schwab C et al. (2014). Gene expression of lactobacilli in murine forestomach biofilms. *Microb Biotechnol.*, 7(4): 347-59.
- Song Z et al. (2019). *Schizosaccharomyces pombe* can Reduce Acetic Acid Produced by *Baijiu* Spontaneous Fermentation Microbiota. 7(12): 606.
- Sugahara H et al. (2015). Probiotic *Bifidobacterium longum* alters gut luminal metabolism through modification of the gut microbial community. *Sci Rep.*, 5: 13548.
- Weckx S et al. (2011). Metatranscriptome analysis for insight into whole-ecosystem gene expression during spontaneous wheat and spelt sourdough fermentations. *Appl Environ Microbiol.*, 77(2): 618-26.
- Weckx S (2010). Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. *Appl Environ Microbiol.*, 76(16): 5402-8.
- Wu Q et al. (2017). Effect of Microbial Interaction on Urea Metabolism in Chinese Liquor Fermentation. *J Agric Food Chem.*, 65(50): 11133-11139.


- Yang M et al. (2020). Direct Metatranscriptome RNA-seq and Multiplex RT-PCR Amplicon Sequencing on Nanopore MinION - Promising Strategies for Multiplex Identification of Viable Pathogens in Food. *Front Microbiol.*, 11: 514.
- Yang Y et al. (2014). Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. *Journal of Archaeological Science*, 45: 178-186.
- Yi Z et al. (2018). Directly mining a fungal thermostable  $\alpha$ -amylase from Chinese Nong-flavor liquor starter. *Microb Cell Fact.*, 17(1): 30.
- Yi Z et al. (2019). Unraveling the Contribution of High Temperature Stage to Jiang-Flavor Daqu, a Liquor Starter for Production of Chinese Jiang-Flavor Baijiu, With Special Reference to Metatranscriptomics. *Front Microbiol.*, 10: 472.

## Bioinformática e kefir: quais os benefícios na saúde humana do probiótico mais antigo já descoberto?

 10.46420/9786588319543cap5


Diego Lisboa Rios<sup>1\*</sup> 


Silvia de Siqueira Costa<sup>2</sup> 

Thiago Araújo Andrade<sup>3</sup> 

Paula Margarita Salazar Torres<sup>4</sup> 

Lucas Roberto da Silva<sup>5</sup> 

Pedro Gontijo Carneiro<sup>6</sup> 

Kerley dos Santos Alves<sup>7</sup> 

Welington Ribeiro Aquino Marques<sup>8</sup> 

João Batista Matos Júnior<sup>9</sup> 

Fabyola Antunes Gonçalves Souza<sup>10</sup> 

### INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos fermentados são há muito tempo associados à capacidade de conferir benefícios à saúde daqueles que os consomem regularmente. Foi a pesquisadora Ellie Metchnikoff quem teorizou pela primeira vez o impacto desses produtos na microbiota bacteriana do intestino (Metchnikoff, 1908). De fato, muitos alimentos que contêm probióticos normalmente são ingeridos através de produtos lácteos fermentados consumidos por centenas de anos, como iogurte, koumiss e kefir (Correa Franco et al., 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO)/Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Alimentos probióticos devem ser consumidos com quantidade de microrganismos suficientes para passar com segurança ao trato gastrointestinal, podendo também vir na forma de suplementos, como pílulas.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>2</sup> Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Divinópolis - MG.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>4</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>5</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Divinópolis - MG.

<sup>6</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.

<sup>7</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>8</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

<sup>9</sup> Instituto Federal do Acre (IFAC), Rio Branco - AC.

<sup>10</sup> Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto - MG.

\* Autor(a) correspondente: lisboa.zootec@gmail.com

Existem vestígios do consumo de leite fermentado por kefir no Oriente Médio, desde antes da era fenícia (3000 a.C.). Embora não seja tão popular como outros produtos lácteos fermentados, como iogurte e queijo, o kefir foi originalmente consumido por comunidades nas montanhas do Cáucaso e associado à benefícios à saúde por centenas de anos. A bebida em si normalmente tem uma textura levemente viscosa com sabor ácido, baixos níveis de álcool e, em alguns casos, leve carbonatação. Tradicionalmente, o kefir é feito com leite de vaca, mas pode ser feito com leite de outras fontes, como leite de cabra, ovelha, búfalo ou soja (Liu et al., 2006). Uma das características que distinguem o kefir de muitos outros produtos lácteos fermentados é a exigência da presença de um grão de kefir na fermentação (Carasi et al., 2015). Os grãos de kefir são matrizes compostas de proteínas e polissacarídeos de origem microbiana, juntamente com comunidades de espécies bacterianas e fúngicas essenciais para a fermentação da bebida (Iraporda et al., 2014). Tradicionalmente a fermentação era iniciada pela adição de grãos de kefir ao leite ainda não fermentado em bolsas de pele de ovelha ou cabra (Liu et al., 2006). A produção comercial em escala industrial raramente utiliza grãos de kefir para fermentação, mas usa culturas iniciais de microrganismos que foram isolados de grãos de kefir, ou kefir para fornecer outros produtos como queijo (Hong et al., 2011). Embora esse kefir produzido industrialmente possa ter seus próprios benefícios à saúde, pesquisas que examinam esses benefícios ainda não foram publicadas.

Assim, qualquer kefir referido nesta revisão foi produzido de maneira tradicional, ou seja, usando os grãos de kefir. Além da população microbiana presente no kefir, estas bebidas também contêm produtos de fermentação em abundância, como ácidos orgânicos e vários compostos aromatizantes voláteis, incluindo etanol, acetaldeído e diacetil (Güzel-Seydim et al., 2000). O kefirano, um importante exopolissacarídeo produzido como parte do processo de fermentação, é exclusivo do kefir. O kefirano compõe uma grande porção do próprio grão de kefir e também é encontrado dissolvido na fase líquida, onde contribui para a reologia, cremosidade e textura do produto acabado (Tsai et al., 2012).

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Imunomoduladores*

Uma das principais maneiras pelas quais os produtos probióticos, como o kefir, são capazes de produzir benefícios à saúde é através da modulação do sistema imunológico gastrointestinal. Quando camundongos jovens inoculados intraduodenalmente com toxina da cólera (CT) foram alimentados com kefir, os níveis de IgA anti-CT no soro aumentaram, assim como os níveis de secreção de anti-CT IgA nos adesivos de Peyer, nos linfonodos mesentéricos, no baço, e a lâmina própria intestinal em comparação com a TC (Carasi et al., 2015). Esse mesmo efeito, no entanto, não foi observado em camundongos mais velhos submetidos ao mesmo tratamento, sugerindo que qualquer mecanismo responsável pela mudança observada nos camundongos jovens não está mais presente nos camundongos senescentes ou requer uma

dose muito maior de kefir em camundongos para ativá-lo. Estudos adicionais sobre o mecanismo, bem como investigações com camundongos de meia idade, são necessários para fornecer mais informações sobre esse fenômeno. Ainda assim, diversos trabalhos investigaram o efeito imunomodulatório do kefir (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação das pesquisas realizadas demonstrando o efeito imunomodulatório do Kefir.

Modelo/ hospedeiro	Probiótico/ Porção do Kefir	Patógeno	Resultado	Autor
Camundongos C57BL/6	Bebida de Kefir.	<i>Giardia intestinalis</i>	Mitigou a capacidade do patógeno de suprimir a resposta inflamatória. Aumentos nos níveis de expressão de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e níveis mais altos de células positivas para IgA e positivas para R <sub>h</sub> Fc $\epsilon$ .	(Correa Franco et al., 2013)
Camundongos	Bebida de Kefir.	-	Aumento nas células IgA, IgG, e nos níveis de IL-4, IL-10, IL-6 e IL-2 que promovem uma resposta Th2.	(Vinderola et al., 2005) *
Camundongos	Grão de Kefir.	-	Aumento nos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, e nos níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-10 e IL-6 em células.	(Vinderola et al. 2006) **
<i>in vitro</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. isolados do Kefir.	-	Induzem níveis mais altos de secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-8, IL-12 e diminuem a resposta de <i>ccl20</i> em células Caco-2, agonistas de receptores Toll-like (TLR).	(Carasi et al., 2015) ***
Camundongos	<i>Lactobacillus kefirano</i> faciens isolados do Kefir.	-	Diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ e IL-12, enquanto aumenta simultaneamente o nível da citocina anti-inflamatória IL-10, inibindo a produção de IL-12 e IL-1 $\beta$ .	(Hong et al., 2009)

Camundongos	<i>L. kefirano</i> <i>faciens</i> isolados do Kefir.	-	Melhora da colite induzido por DSS e das respostas Th1 a agonistas de TLR em camundongos livres de germes, aumentando a produção de IFN- $\gamma$ e IL-12 após estimulação.	(Chen et al., 2013)
Camundongos	<i>L. kefirano</i> <i>faciens</i> isolados do Kefir.	-	Diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ , enquanto aumentava a produção de IL-10.	(Chen et al., 2012) ****
<i>in vitro</i> Caco-2-ccl20: luc	Fração livre de células do kefir.	Proteína flagelar FliC de Salmonella.	Modulou respostas imunes inatas, diminuindo a ativação das células Caco-2-ccl20: luc que foram estimuladas pelo patógeno.	(Iraporda et al., 2014) *****
<i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	Kefir inteiro, frações de kefir ou organismos isolados.	-	Mudança da resposta imune Th1 para uma resposta Th2, além de aumentos nos níveis de IgA.	(Carasi et al., 2015)
Camundongos <i>germfree</i> (GF)	Bebida de Kefir.	-	Único estudo que indica resposta Th1 aumentada.	(Chen et al., 2013) *****

\* Curiosamente, aumentos em IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-12 (todos pró-inflamatórios que promovem resposta Th1) foram observados apenas em camundongos alimentados com kefir pasteurizado.

O aumento de citocinas pró-inflamatórias nos grupos de kefir pasteurizado foi provavelmente devido à integridade da parede celular reduzida das células mortas pelo calor, expondo mais produtos microbianos inflamatórios. O fato de o kefir pasteurizado ter sido capaz de provocar um efeito mostra que os mecanismos por trás dessa modulação imune não são totalmente dependentes das células vivas e podem ser devidos aos metabólitos presentes no kefir (Iraporda et al., 2014). No entanto, deve-se notar que, neste estudo, as células vivas tiveram um impacto geralmente mais substancial, pois o kefir foi capaz de conferir um efeito semelhante a 1/10 da concentração e sem provocar uma resposta imune pró-inflamatória (Vinderola et al., 2005)

\*\* Quando alimentados com camundongos por mais de 2 a 7 dias, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  aumentaram precocemente na alimentação, no entanto, diminuíram rapidamente de volta aos níveis de controle no dia 7, juntamente com IL-1 $\alpha$ , enquanto os níveis de IL-6 e IL-10 permaneceram altos durante os 7 dias de período de alimentação (Vinderola et al. 2006).

\*\*\* Em geral, linhagens de *L. kefir* que induziram menores taxas de TNF- $\alpha$ /IL-10 e maiores de IL-10/IL-12 mostraram uma diminuição muito maior na resposta pró-inflamatória da ccl20 à estimulação com flagelos bacterianos, indicando a importância de IL-10 na promoção de uma resposta Th2 enquanto inibe simultaneamente a resposta pró-inflamatória Th1. camundongos alimentados com *L. kefir* por um período de 21 dias mostrou perfis alterados de expressão gênica no íleo, cólon, adesivos de Peyer e linfonodos mesentéricos, com citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-23 sendo sub-reguladas e IL-10 sendo sub-regulada (Carasi et al., 2015). Isto indica ainda que os lactobacilos isolados do kefir têm a capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias enquanto promovem a produção de citocinas anti-inflamatórias.

\*\*\*\* Esse efeito também foi dependente do TLR-2, pois *L. kefirano* M1 foi incapaz de melhorar a colite por DSS em camundongos *knockout* para TLR-2 (Chen et al., 2012).

\*\*\*\*\* Um dos mecanismos prováveis foi revelado quando se descobriu que uma solução de ácido láctico 100 mM a pH 7, era capaz de provocar um nível comparável de modulação imune em células estimuladas por FliC, quando pré-incubadas com a solução. Verificou-se também que a solução de ácido láctico diminui o nível de ativação de NF- $\kappa$ B nas células Caco-2 estimuladas com FliC e foi capaz de regular a expressão das citocinas pró-inflamatórias ccl20, IL-8, CXCL 2 e CXCL 10 sem afetar os genes envolvidos na função normal dos enterócitos. Estes resultados indicam quão importantes são os metabólitos produzidos

durante a fermentação para a capacidade do kefir de provocar respostas ou efeitos benéficos no hospedeiro (Iraporda et al., 2014).

\*\*\*\*\* Isso pode explicar a diferença nos achados, pois é bem possível que as observações dos camundongos *germfree* (GF) tenham mais a ver com a introdução de uma população bacteriana no intestino do que com as espécies bacterianas específicas que compunham essa população. O fato de a maioria dos estudos também observarem aumentos em algumas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ou IL-12, pode ser explicado por uma reação inicial do sistema imunológico a agonistas comuns de TLR presentes, que foram ao final suprimidos após uma maior interação com as células imunes do trato GI (Chen et al., 2013).

### Antialérgicos

Doenças alérgicas, como asma e alergia alimentar, estão há décadas em ascensão em países desenvolvido (Sjogren et al., 2009). Muitas alergias, especialmente aquelas relacionadas à alimentação, são desenvolvidas precocemente, durante os primeiros 2 anos de vida (Tsai et al., 2012). Embora a maioria das alergias alimentares desenvolvidas no início da vida não persistam, algumas podem se tornar condições permanentes ao longo da vida (Tsai et al., 2012). Trabalhos recentes mostraram que um fator cada vez mais importante na determinação de uma criança propensa a desenvolver doenças alérgicas, seja alergia alimentar ou asma, é o nível de complexidade dos organismos presentes na microbiota intestinal (Hong et al., 2011). A Tabela 2 compila alguns trabalhos relacionando o uso de probiótico, ou alguma porção do kefir, com a modulação de alergias.

**Tabela 2.** Ensaios que mostram ação antialérgica de probióticos, kefir.

Ensaio	Probiótico/ Porção do Kefir	Modelo	Resultado	Autor
Humanos (1 semana - 5 anos)	<i>Bifidobacterium</i> ssp. e <i>Lactobacillus</i> do grupo 1	-	Crianças que desenvolveram alergias tinham menores colônias de organismos citados em sua microbiota intestinal durante os primeiros 2 meses de vida.	(Sjogren et al., 2009)
Humanos (0 - 1 ano)	<i>Bifidobacterium</i> ssp.	-	Suplementação do organismo na alimentação parece diminuir a inflamação intestinal em crianças com alergias pela redução de bacteroides.	(Kirjavainen et al., 2002)



<i>in vivo</i> Camundongos BALB/c	Kefir tradicional e de leite de soja	Modelo de alergia alimentar, sensibilizados pela ovoalbumina (OVA)	Administração oral do kefir reduziu alergia alimentar pelo aumento da colonização de bifidobactérias e lactobacilos, além de suprimir a resposta IgE e IgG1 anti-OVA.	(Liu et al., 2006)*
<i>in vitro</i> Células mononucleares do sangue periférico (CMSPs)	Bactérias ácido láticas (BALs)	-	A adição de BALs em culturas de CMSPs resultou na redução de IL-4, indutor de resposta Th2, e no aumento de IFN- $\gamma$ , repressor de resposta TH2.	(Tsai et al. 2012)**
<i>in vivo</i> Camundongos BALB/c	Bactérias ácido láticas (BALs)	Modelo de alergia alimentar, sensibilizados pela OVA	A alimentação contendo BALs reduziu, tanto a IgE total, quanto IgE específica para OVA, em comparação ao grupo que não recebeu o probiótico.	(Tsai et al. 2012)**
<i>in vivo</i> Camundongos BALB/c	Kefir	Modelo de asma, vias aéreas sensibilizadas pela OVA	A administração do kefir mostrou redução da hiper- responsividade das vias aéreas, do número de células inflamatórias, das citocinas da resposta Th2 e dos níveis de IgE total.	(Lee et al., 2007)
<i>in vitro</i> Esplenócitos de BALB/c	<i>L. kefirano</i> <i>faciens</i> e <i>L. kefir</i> i isolados de Kefir e inativados por calor.	-	Mesmo após a inativação, a administração resultou na aumento de citocinas da resposta Th1, como IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ , IL- 12 e IL-1 $\beta$ .	(Hong et al., 2010)
<i>in vivo</i> Camundongos BALB/c	<i>L. kefirano</i> <i>faciens</i> e <i>L. kefir</i> i isolados de Kefir e inativados por calor.	Modelo de alergia alimentar, sensibilizados pela OVA	Além da modulação da resposta Th1/Th2, o grupo tratado reduziu os níveis de IgE anti-OVA no soro.	(Hong et al., 2010)

Houve também um aumento na detecção das células T reguladoras no baço.

<i>in vivo</i>	<i>L. kefir</i> e <i>L. kefir</i> isolados de Kefir e inativados por calor.	Modelo de asma, vias aéreas sensibilizadas pela OVA	A administração foi capaz de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, de citocinas da resposta Th2, como IL-4, IL-6, IL13. e ccl20 nos esplenócitos, de IgE anti-OVA no soro, da citocina associada à resposta Th17, IL-17, além dos níveis de células T reguladoras presentes no baço.	(Hong et al., 2011)
Camundongos BALB/c				

\* Liu e colaboradores (2006), apresentaram um modelo de alergia alimentar em camundongos BALB/c através da injeção intraperitoneal de ovoalbumina (OVA). OVA, principal proteína encontrada no ovo.

\*\* Um dos principais mecanismos por trás da alergia alimentar é um desequilíbrio na proporção de células Th1/Th2, levando a uma resposta IgE aumentada (Tsai et al. 2012).

Embora todos esses estudos revelem um padrão consistente, é interessante notar que muitos dos perfis de citocinas estão em forte contraste com os encontrados em estudos sem sensibilização ou desafio ao antígeno. Isso destaca a complexidade do sistema imunológico e a necessidade de um equilíbrio entre as diferentes reações possíveis, como as respostas Th1 e Th2. O fato do kefir poder induzir mudanças no sistema imunológico em ambas as direções é promissor, pois pode significar que os diversos organismos no kefir são capazes de regular esse equilíbrio no sistema imunológico. Isso pode ser em parte devido ao aumento do número de células T reguladoras observadas em alguns desses estudos, já que essas células desempenham um papel importante na manutenção da tolerância e na supressão de respostas imunes inflamatórias desnecessárias (Chen et al., 2013).

### ***Metabolismo do colesterol e inibição da eca***

Devido à microbiota altamente complexa do kefir, há uma infinidade de organismos e produtos metabólicos presentes no leite fermentado. Essa combinação de organismos microbianos e metabólitos vivos contribui para uma ampla gama de efeitos atribuídos ao kefir, muitos dos quais são benefícios à saúde. A doença cardiovascular (DCV) é uma das principais causas de morte no ocidente, com altos níveis de colesterol sérico sendo um importante fator de risco para a doença (Tabela 3). A dieta pode desempenhar um papel importante no gerenciamento dos níveis séricos de colesterol e, portanto, os riscos de contrair DCV (FAO/WHO, 2002).

**Tabela 3.** Resultados de pesquisas que corroboram para efeito redutor de níveis séricos de colesterol e inibição da ECA causados pelo Kefir.

Ensaio	Probiótico/Porção do Kefir	Resultado	Autor
Método colorimétrico de o-ftalaldeído	Grãos de Kefir do tipo A, B, C e P originados da Iugoslávia, tipo M da Hungria e tipo K do Cáucaso inoculados com leite integral instantâneo.	Reduziu os níveis de colesterol presentes entre 41 e 84% após 24 horas de fermentação e mais 48 horas de armazenamento.	(Vujičić et al., 1992)*
<i>In vivo</i> Camundongos albinos	Iogurte contendo soro de leite condensado hidrolisado com lactose e iogurte com <i>Bifidobacterium bifidum</i> 2715	Após 30 dias, a alimentação reduziu os níveis de colesterol sérico significativamente.	(Serafini et al., 2014).
Método colorimétrico de o-ftalaldeído	<i>Kluyveromyces marxianus</i> linhagem K1 e linhagem M3 fermentado em meio de lactose de batata.	Após 20 horas, os níveis de colesterol diminuíram de 70 a 99% com um aumento proporcional significativo da atividade de hidrólise do sal biliar (BSH).	(Liu et al., 2012)**
<i>In vivo</i> Hamsters sírios dourados machos	Leite desnatado reconstituído e leite de soja inoculado com 5% de grãos de kefir	Reduziram o triacilglicerol sérico e o colesterol total após 8 semanas, melhorando o índice aterogênico. Níveis de secreção de ácido biliar fecal e colesterol aumentaram significativamente.	(Liu et al., 2006)***
<i>In vivo</i> Camundongos machos Sprague-Dawley (SD) e homens voluntários adultos saudáveis	Leite de fermentado com o probiótico <i>B. longum</i> linhagem BL1 (Moringa Milk Industry Co.) e iniciadores comuns de iogurte.	Após 4 semanas, a concentração de colesterol no fígado foi reduzida e os níveis de secreção de ácido biliar fecal e colesterol aumentaram significativamente nos dois grupos.	(Xiao et al., 2003).****
<i>In vivo</i> Camundongos machos SD	Pó liofilizado de <i>Lactobacillus plantarum</i> MA2, isolado de grãos de kefir de Taiwan (chamados Hsinchu, Mongólia e Ilan).	Redução significativa após 5 semanas de níveis séricos de colesterol total, LDL-colesterol, triglicerídeos, colesterol hepático e triglicerídeos, em conjunto com a secreção aumentada de colesterol fecal.	(Wang et al., 2009).

<i>In vivo</i> Camundongos machos SD	<i>L. plantarum</i> Lp09 e Lp45 isolados de grãos de Kefir.	Redução significativa após 4 semanas dos níveis séricos de colesterol total, LDL-colesterol, triglicerídeos, colesterol hepático e triglicerídeos, juntamente com uma maior secreção de colesterol nas fezes.	(Huang et al., 2013)
<i>In vivo</i> Camundongos SD	<i>L. plantarum</i> Lp27 isolado de grãos de kefir tibetano.	Reduziu significativamente as concentrações de colesterol total sérico, colesterol de lipoproteína de baixa densidade e triglicerídeos.	Huang et al. (2013)
<i>In vitro</i> Células Caco-2	<i>L. plantarum</i> Lp27 isolado de grãos de kefir tibetano.	Inibiu a absorção de colesterol através da regulação negativa da expressão de Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) em células Caco-2.	Huang et al. (2013)
<i>In vivo</i> Camundongos SD	<i>L. acidophilus</i> LA15, <i>L.</i> <i>plantarum</i> B23 e <i>L. kefir</i> . isoladas de grãos de kefir tibetano.	Os níveis de colesterol total, triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade no soro foram significativamente diminuídos após 4 semanas, junto com o aumento da secreção de colesterol fecal e ácido biliar.	Zheng et al. (2013)
<i>In vitro</i> Células Caco-2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA15, <i>L. plantarum</i> B23 e <i>L. kefir</i> D17	As linhagens expressaram alta aderência em células Caco-2 e mostraram atividade potencial de hidrólise do sal biliar (BSH), assimilação e capacidade de co- precipitação do colesterol.	Zheng et al. (2013)
<i>In vivo</i> Camundongos Wistar machos	KM-WC (Células Inteiras de levedura inoculadas com <i>K.</i> <i>marxianus</i> YIT 8292) e KM-W (frações de parede celular enriquecida de <i>K.</i> <i>marxianus</i> YIT 8292).	Após 14 dias, os níveis de colesterol no plasma e no fígado foram reduzidos, além de aumentar a excreção fecal de esteróis e ácidos biliares, e a concentração de ácidos graxos de cadeia curta no ceco.	(Yoshida et al., 2005)*****
<i>In vivo</i> Camundongos espontaneamente hipertensos e propensos a derrame (SHRSP/Hos)	K-R, kefirano isolado da cultura de <i>L.</i> <i>kefirifaciens</i> em meio RH.	O kefirano reduziu significativamente após 30 dias os níveis de colesterol total sérico, LDL-colesterol sérico, triglicerídeos séricos, colesterol hepático e triglicerídeos hepáticos, além de ter efeitos significativos sobre a pressão arterial, glicose sanguínea e constipação.	(Maeda et al., 2004)

Ensaio espectrofotométrico de Cushman e Cheung	Leite enriquecido com caseína fermentado por <i>Lactobacillus helveticus</i> CP790 cultivado com grãos de Kefir comercial (Torula) que continham bactérias ácido lácticas (LAB)	Dois pequenos peptídeos com sequência “PYVRYL” e “LVYPF”TGPIPN” liberados da caseína durante o processo de fermentação mostraram uma potente atividade inibitória da ECA com valores de IC50 de 2,4 e 27,9 $\mu$ M, respectivamente.	(Quiros et al., 2005)
Homens adultos levemente hipercolesterolêmicos	Dietas auto-selecionadas, suplementadas com 500 mL / d de kefir (Liberty Co, Candiac, Quebec) ou leite.	Sem alterações significativas nas concentrações séricas totais de colesterol, após 4 semanas.	St-Onge et al. (2002)*****
<i>In vivo</i> Camundongos Wistar fêmeas	Grãos de kefir obtidos de uma residência particular em Navarra, Espanha, inoculados em gordura total de leite de vaca processada.	Não encontrou diferenças significativas no colesterol sérico após 22 dias	(Urdaneta et al., 2007)*****

\* Método o-ftalaldeído: Originalmente descrito para a medição do colesterol do plasma sanguíneo humano; saponificação de lipídios plasmáticos por KOH alcoólico obtido por extração de material insaponificável em hexano, secagem do extrato sob nitrogênio e desenvolvimento de cor com reagente o-ftalaldeído em meio ácido.

\*\* O BSH desconjuga os ácidos biliares e, como os sais biliares desconjugados são menos solúveis e reabsorvidos com menos eficiência do lúmen intestinal, isso leva ao aumento da excreção de sal biliar nas fezes.

\*\*\* Aterogênico: Proporção entre colesterol não HDL e colesterol HDL. O efeito de redução do colesterol foi independente de os hamsters terem sido alimentados com dieta livre de colesterol ou enriquecida com colesterol indicando que a alimentação com kefir alterou o metabolismo endógeno do colesterol.

\*\*\*\* Iniciadores de iogurte: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

\*\*\*\* Este efeito mostrou-se específico para  $\alpha$ -manano e  $\beta$ -glucano presentes na parede celular de *K. marxianus*.

\*\*\*\*\* Embora os dois últimos estudos pareçam conflitar com outros achados, isto pode ser em grande parte devido ao fato de que diferentes grãos de kefir foram usados para cada um desses estudos. Além disso, Liu e colaboradores (2006) revelaram em estudo com duração de 8 semanas, enquanto St-Onge e colaboradores (2002) e Urdaneta e colaboradores (2007) tiveram prazos de 4 semanas e 22 dias, respectivamente. Pode ser significativo que, no estudo de pacientes hipercolesterolêmicos, tenha sido observado um aumento no ácido propiônico fecal. Demonstrou-se que o ácido propiônico inibe a incorporação de acetato no triacilglicerol e colesterol plasmático (Zheng et al., 2013). Assim, um efeito hipocolesterolêmico poderia ter sido observado se o estudo continuasse por um período mais longo.

### Exclusão de patógenos

Uma das principais maneiras pelas quais produtos alimentares contendo probióticos podem exercer efeitos benéficos é alterar a microbiota intestinal. Isso pode ser feito através da introdução de novas espécies ou linhagens no trato gastrointestinal ou promovendo o crescimento de microrganismos benéficos que já estão presentes (prebióticos). Alguns exemplos são apresentados na Tabela 4.

Em vários estudos, o consumo de kefir ou kefirano em um modelo animal tem sido associado a um aumento de microrganismos considerados benéficos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ao mesmo tempo em que diminui espécies microbianas nocivas, como *Clostridium perfringens* (Liu et al., 2006).

**Tabela 4.** Efeito antagônico do kefir e seus derivados sobre patógenos.

Modelo/ hospedeiro	Probiótico/ Porção do Kefir	Patógeno	Resultado	Autor
Camundongos C57BL/6	Bebida de Kefir.	<i>G. intestinalis</i>	Capaz de reduzir a gravidade da infecção por <i>Giardia intestinalis</i> , com o mecanismo relatado sendo através da modulação do sistema imunológico.	(Correa Franco et al., 2013)
Camundongos	<i>Lactobacillus</i> isoladas de kefir.	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> e <i>Escherichia</i> <i>coli</i> O157: H7	Foi demonstrado que linhagens específicas aderem às células Caco-2 e inibem a aderência dos patógenos.	(Huang et al. 2013)*
Camundongos BALB/c	<i>L. kefirano</i> M1	<i>E. coli</i> O157: H7	Mostraram sintomas reduzidos de infecção, incluindo danos intestinais e renais, translocação bacteriana e penetração da toxina Shiga, bem como aumento das respostas <i>IgA</i> da mucosa específicas para EHEC.	(Chen et al., 2013)
<i>in vitro</i>	Bebida de Kefir.	<i>E. coli</i> O157: H7	Observaram que os isolados do kefir têm a capacidade de proteger as células Vero da toxina Shiga tipo II produzida pelo patógeno, levando a níveis mais baixos de morte celular.	(Kakisu et al., 2013)
<i>in vitro</i>	Bebida de Kefir.	<i>Bacillus cereus</i>	Inibiu a capacidade dos fatores extracelulares do patógeno de causar danos às células Caco-2.	(Kakisu et al., 2007)

<i>in vitro</i>	Bebida de Kefir.	-	Além de regular a composição microbiana, o kefir pode alterar a atividade da microbiota. Foi demonstrado que certas linhagens de <i>Bifidobacterium</i> exibem aumentos na taxa de crescimento quando cultivadas em kefir e mudanças na expressão gênica também foram observadas.	(Serafini et al., 2014)**
-----------------	------------------	---	---	---------------------------

\* A capacidade dessas espécies de *Lactobacillus* se ligarem às células Caco-2 ilustra um provável mecanismo para o aumento de espécies de *Lactobacillus* observadas na microbiota fecal de camundongos alimentados com kefir (Liu et al., 2006; Carasi et al., 2015).

\*\* Essas alterações na expressão gênica resultaram em níveis aumentados de expressão de múltiplos genes associados ao *pil3*, um pilus dependente de Sortase que demonstrou ser extremamente importante para a interação com as células endoteliais do hospedeiro e é também especialmente importante para a adesão e modulação da resposta inflamatória do hospedeiro. Embora este exemplo específico mostre os potenciais efeitos positivos que o kefir pode ter sobre os organismos existentes na microbiota intestinal, ainda não está claro como isso se traduz na complexa população de todo o microbioma (Serafini et al., 2014).

### Propriedades antibacterianas e antifúngicas

O kefir e linhagens de microrganismos associadas ao kefir mostraram uma infinidade de atividades antibacterianas e antifúngicas (Tabela 5). O leite fermentado com kefir foi testado em experimentos de difusão em disco contra uma ampla variedade de espécies bacterianas e fúngicas patogênicas, e se constatou ter atividade antimicrobiana igual a ampicilina, azitromicina, ceftriaxona, amoxicilina e cetoconazol contra muitas dessas espécies (Zanirati et al., 2015). Além dos efeitos antimicrobianos do leite fermentado com kefir, também existem microrganismos específicos que exercem propriedades antimicrobianas por conta própria.

**Tabela 5.** Correlação da atividade antimicrobiana isoladas a partir do Kefir.

Probiótico/ Porção do Kefir	Substância produzida	Patógeno	Resultado	Autor
<i>L. plantarum</i> ST8KF	Bacteriocina ST8KF.	<i>Enterococcus mundtii</i> e <i>Listeria innocua</i>	Exibe atividade bacteriostática, e não é produzida em níveis elevados durante as fases iniciais de produção do Kefir.	(Powell et al., 2007)



<i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefirano</i> <i>faciens</i> e <i>S. thermophilus</i> ,	-	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Y. enterocolitica</i>	Mostraram atividade antimicrobiana contra uma gama de patógenos quando submetidos ao teste de ponto de ágar.	(Golowczyc et al., 2008)*
Lactobacilos derivados do Kefir	-	<i>S. typhimurium</i> e <i>E. coli</i> .	Indicaram atividade antimicrobiana em testes <i>in vitro</i> .	(Golowczyc et al., 2008)*
<i>L. lactis</i>	Lacticina 3147	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. difficile</i>	A lacticina 3147 é produzida por uma linhagem de <i>L. lactis</i> isolada do kefir e possui ampla atividade antimicrobiana.	(Rea et al. 2007)
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> estirpe fonte FX-6	Bacteriocina F1	<i>S. aureus</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Primeira linhagem produtora de bacteriocina com amplo espectro antimicrobiano para inibir fungos e bactérias.	(Miao et al., 2014)
<i>L. kefir</i> B6	-	<i>L. monocytogenes</i>	Exibe atividade antimicrobiana na presença de galactooligossacarídeo <i>in vitro</i> , no entanto, esse efeito não foi observado com <i>E. coli</i> e, nesse caso, uma investigação mais aprofundada do mecanismo dessa inativação é necessário	(Likotrafiti et al., 2015)*
<i>L. lactis</i> e <i>Lb. paracasei</i>	Substância semelhante a bacteriocina	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i>	Faz-se necessário mais trabalhos para melhor caracterizar essas substâncias e determinar o alcance de seus antimicrobianos. atividade, bem como sua novidade.	(Leite et al. 2015)
<i>L. kefirano</i> <i>faciens</i> 8U	BAL	<i>P. aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. faecalis</i> <i>in vitro</i>	Pesquisas posteriores se fazem necessária para elucidar o mecanismo de inibição.	(Zanirati et al., 2015)

\* É provável que a capacidade do meio seja aumentada com hidróxido de sódio, sais e ácidos orgânicos presentes no filtrado, ao ponto que a cultura *L. monocytogenes* seja inibida pelos seus próprios resíduos produzidos no metabolismo ácido.

***Efeitos antitumorais***

O Kefir também possui atividade antitumoral significativa contra vários tipos de células cancerígenas (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultados de pesquisas que corroboram para efeito do kefir contra diversos tipos de câncer.

<b>Modelo/hospedeiro</b>	<b>Probiótico/ Porção do Kefir</b>	<b>Tipo de câncer</b>	<b>Resultado</b>	<b>Autor</b>
<i>in vitro</i>	<i>L. kefir</i>	Leucemia mielóide	Foi demonstrado que o probiótico aumenta a apoptose de várias células de leucemia mielóide resistentes a medicamentos, através da ativação em doses adequadas de Caspase 3.	(Ghoneum et al., 2014)
<i>in vitro</i>	Bebida de Kefir.	Câncer gástrico	A fração isenta de células do kefir mostrou atividade antitumoral <i>in vitro</i> , se observou um efeito anti-proliferativo na linha de células de câncer gástrico SGC7901.	(Gao et al., 2013)*
<i>in vitro</i>	Bebida de Kefir.	Câncer gástrico	Além de promover a morte celular em células cancerígenas, efeitos antimutagênicos foram demonstrados em estudos com agentes cancerígenos conhecidos, como metilmetanossulfato, metilazoximetanol, azida sódica, aflatoxina B1 e 2-aminoantraceno, conforme indicado pelo teste de Ames.	(Guzel-Seydim et al., 2006)

Camundongos	Bebida de Kefir.	Sarcomas	Os camundongos com sarcomas de células fusiformes que receberam kefir intraperitoneal reduziram o tamanho do tumor, sendo que em alguns tumores desaparecendo completamente durante um período de tratamento de 20 dias.	(Liu et al., 2012)**
Camundongos	Bebida de Kefir	Câncer de mama	Mostrou que a alimentação com kefir antes da provocação do tumor, resultou em diminuição do tamanho e aumento da apoptose do tumor, e que os níveis de células IgA + e células T CD4 + também foram aumentados. Também apresentaram níveis séricos aumentados de IL-10 e IL-4.	(De Moreno de LeBlanc et al., 2007)***

\* Este estudo demonstrou ainda que a bebida de kefir foi capaz de induzir apoptose em células SGC7901 através da regulação positiva do gene *bax*, do promotor de apoptose e anti-oncogene, e da regulação negativa do gene *bcl-2*, que é um conhecido oncogene inibidor da apoptose (Gao et al., 2013).

\*\* Embora isso seja impressionante, ainda não foi determinado se esses achados podem ser replicados no caso do consumo oral.

Esses estudos mostraram aumentos nas contagens de células imunes e no recrutamento, apontando para um possível mecanismo para a redução do tamanho do tumor. Tais achados são consistentes com outros estudos que mostraram que o kefir é capaz de modular o sistema imunológico no intestino e mostram que as habilidades imunomoduladoras do kefir podem não estar limitadas ao Camundongo gastrointestinal (Hong et al., 2009; Correa Franco et al., 2013).

### Cicatrização de feridas

As propriedades antimicrobianas do kefir podem levar ao seu uso em aplicações não tradicionais. De fato, quando camundongos com feridas abertas inoculadas com *S. aureus* foram tratados com um gel

feito de grãos de kefir, verificou-se que as feridas cicatrizavam a uma taxa muito mais rápida do que a observada em camundongos controle que não receberam tratamento, ou em camundongos que receberam tratamento tradicional (tratamento de 5 mg/kg de emulsão de neomicina-clostebol) (Ghoneum et al., 2014). Verificou-se que os géis feitos com grãos e bebida de kefir são mais eficazes na redução do tamanho da ferida em queimaduras de terceiro grau contaminadas por *P. aeruginosa*, do que o tratamento tradicional com sulfadiazina de prata em um modelo de camundongo com feridas de queimadura (Hong et al., 2011; Zheng et al., 2013). Ainda, um estudo usando como modelo coelhos com ferida aberta contaminada, também se observou que o gel produzido a partir de grãos de kefir resultou em tempos de cicatrização mais rápidos e eliminação mais rápida de infecções (Hong et al., 2011).

Tais reduções no tempo de cura provavelmente são devidos a vários fatores. Um destes é a capacidade do kefir de inibir o crescimento de bactérias e fungos, levando a uma ferida mais limpa, como demonstrado em alguns estudos (Hong et al., 2011; Tsai et al. 2012). Outro fator possível é a capacidade de modular o sistema imunológico e recrutar células imunológicas para ajudar no processo de cicatrização.

### ***Benefícios de saúde do fermento de kefir***

Uma característica única do kefir, tradicionalmente produzido em relação a muitos outros produtos lácteos fermentados produzidos comercialmente, é a presença de uma grande população de leveduras nos grãos de kefir e no leite fermentado por este (Carasi et al., 2015). Embora a maioria dos microrganismos probióticos comercializados sejam bactérias como lactobacillus e bifidobactérias, existem algumas espécies e linhagens de leveduras que são reconhecidas por possuir propriedades probióticas, como *Saccharomyces boulardii* (Rea et al., 2007). *S. boulardii* demonstrou melhorar os sintomas de *Clostridium difficile*, diarreia associada, bem como reduzir a inflamação, alterar o estado imunológico e as reações no intestino, levando à sua adoção como tratamento para a diarreia por *C. difficile* (Rea et al., 2007).

Algumas leveduras do kefir também mostraram atividades imunomoduladoras. Por exemplo a levedura *Kluyveromyces marxianus* B0399 demonstrou ter a capacidade de aderir às células Caco-2 (De Moreno de LeBlanc et al., 2007). Quando co-incubadas com células Caco-2 estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS), foi observada uma diminuição significativa na secreção de IL-10, IL-12, IL-8 e IFN- $\gamma$  (De Moreno de LeBlanc et al., 2007). Além disso, *K. marxianus* B0399 provocou uma diminuição na secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e MIP-1 $\alpha$  quando co-incubadas com PBMCs estimuladas com LPS (De Moreno de LeBlanc et al., 2007). Este mesmo estudo mostrou que, em um sistema de modelo colônico *in vitro*, *K. marxianus* foi capaz de formar estável população, enquanto simultaneamente aumentava os níveis de *Bifidobacterium*. Também foram observados aumentos nos níveis de acetato e propionato de ácidos graxos de cadeia curta. Utilizando a linha celular Caco-2, com um gene repórter *cal20*, Iraporda e colaboradores (2014) foram capazes de mostrar que várias linhagens de levedura

de *Saccharomyces cerevisiae*, *K. marxianus* e *Issatchenkia* spp. foram capazes de inibir a expressão do gene repórter *ccf20* quando incubados com as células antes da estimulação utilizando a proteína flagelar FliC de *Salmonella*. A partir dessas leveduras, *K. marxianus* CIDCA 8154 foi selecionada para testes adicionais, demonstrado possuir a capacidade de inibir os níveis de expressão de *ccf20* nas células Caco-2, independentemente da estimulação por FliC, IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ . A linhagem também inibiu a expressão de IL-8 e MIP-2 $\alpha$  em células HT-29 e inibiu a expressão de *ccf20* em um modelo intestinal de camundongos, quando administrada antes da estimulação com FliC (Iraporda et al., 2014). Leveduras isoladas de kefir também demonstraram a capacidade de melhorar as propriedades probióticas de espécies bacterianas, melhorando a viabilidade dessas linhagens bacterianas ao longo do tempo em suco gástrico e intestinal simulado, melhorando ainda a adesão de BALs às células Caco-2 *in vitro*. Esse efeito provavelmente ocorre devido à cooperação de bactérias e levedura do kefir (Zheng et al., 2013).

## CONCLUSÕES FINAIS

Kefir é um produto lácteo fermentado dinâmico com muitos fatores diferentes que afetam os benefícios associados ao seu consumo. Embora o kefir tenha sido associado a benefícios para a saúde por centenas de anos, a forma exata desses benefícios, até recentemente, não tinha sido estudada. O uso de modelos animais e análises *in vitro* permitiram a elucidação de como o kefir impacta positivamente a saúde do hospedeiro. Kefir inteiro, bem como frações específicas e organismos individuais isolados do kefir, fornecem uma infinidade de efeitos positivos quando consumidos. Estes variam desde a melhoria do metabolismo do colesterol e cicatrização de feridas, até a modulação do sistema imunológico e microbioma e até mesmo o alívio potencial de alergias e câncer. Estudos adicionais sobre os mecanismos por trás desses efeitos permitirão aos cientistas entender melhor exatamente como o kefir e outros produtos lácteos fermentados conferem esses benefícios, bem como maneiras mais eficientes de aproveitar essas características fora do próprio kefir. A necessidade de pesquisas adicionais não se aplica apenas aos mecanismos pelos quais o consumo de kefir exerce esses efeitos, mas também a quais organismos ou partes do kefir são responsáveis por cada benefício. A capacidade de combinar as melhores linhagens possíveis, dos melhores organismos de várias fontes de kefir, cria o potencial para maiores benefícios do que os analisados até então.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carasi P et al. (2015). Impact of Kefir Derived Lactobacillus kefir on the mucosal immune response and gut microbiota. J. Immunol. Res., 361604.

- Chen Y et al. (2013). Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from kefir grains on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection using mouse and intestinal cell models. *J. Dairy Sci.*, 96: 7467–7477.
- Correa Franco M et al. (2013). Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *J. Med. Microbiol* 62 1815–1822. 10.1099/jmm.0.068064-0
- de Moreno de LeBlanc A et al. (2007). Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *J. Dairy Sci.* 90 1920–1928. 10.3168/jds.2006-079
- Gao J et al. (2013). Induction of apoptosis of gastric cancer cells SGC7901 in vitro by a cell-free fraction of Tibetan kefir. *Int. Dairy J.* 30 14–18. 10.1016/j.idairyj.2012.11.011
- Ghoneum M et al. (2014). Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. *Int. J. Oncol.* 44 830–837. 10.3892/ijo.2014.2258 [PMC free article]
- Golowczyc MA et al. (2008). Characterization of homofermentative *Lactobacilli* isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *J. Dairy Res.* 75 211–217.
- Guzel-Seydim Z et al. (2006). Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. *Int. J. Dairy Technol.* 59 209–215.
- Hong WS et al. (2011). Effect of heat-inactivated kefir-isolated *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 on preventing an allergic airway response in mice. *J. Agric. Food Chem.* 59 9022–9031.
- Huang Y et al. (2013). *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *J. Dairy Sci.* 96: 2746–2753.
- Iraporda C et al. (2014). The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food Res. Int.* 62: 247–253.
- Kakisu E et al. (2013). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157: H7. *J. Dairy Res.*, 80: 64–71.
- Kirjavainen P et al. (2002). Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* 51: 51–55.
- Leite A et al. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J. Dairy Sci.*, 98: 3622–3632.
- Likotrafti E et al. (2015). In vitro evaluation of potential antimicrobial synbiotics using *Lactobacillus kefir* isolated from kefir grains. *Int. Dairy J.*, 45: 23–30.
- Liu H et al. (2012). Effect and (Mechanism) of Cholesterol-Lowering by *Kluyveromyces* from Tibetan Kefir. *Adv. Mater. Res.*, 343–344: 290–1298.

- Maeda H et al. (2004). Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5533–5538.
- Metchnikoff E (1908). *The Prolongation of Life*. New York, NY: Putnam.
- Miao J et al. (2014). Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control*, 42: 48–53.
- Powell JE et al. (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int. Dairy J.*, 17: 190–198.
- Quiros A et al. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J. Dairy Sci*, 88: 3480–3487.
- Rea MC et al. (2007). Antimicrobial activity of lacticin 3,147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *J. Med. Microbiol.*, 56: 940–946.
- Serafini F et al. (2014). Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. *Int. J. Food Microbiol.*, 178: 50–59.
- Sjogren YM et al. (2009). Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clin. Exp. Allergy*, 39: 518–526.
- St-Onge MP et al. (2002). Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial [ISRCTN10820810]. *BMC Complement. Altern. Med.* 2: 1.
- Tsai CC et al. (2012). Oral administration of multiple lactic acid bacteria strains suppressed allergic responses IgE in an ovalbumin-induced allergy BALB/c mouse model. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6: 1206-1212.
- Urdaneta E et al. (2007). Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Nutr. Res.*, 27: 653–658.
- Vinderola G et al. (2006). Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*, 211: 149–156.
- Vujičić IF et al. (1992). Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnol Lett* 14: 847–850.
- Wang Y et al. (2009). Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84: 341–347.
- WHO (1982). Prevention of coronary heart disease. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 678: 1–53.
- Xiao J et al. (2003). Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J. Dairy Sci.*, 86: 2452–2461.



- Yoshida Y et al. (2005). Effects of the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a high-cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69: 714–723.
- Zanirati DF et al. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32: 70–76.
- Zheng Y et al. (2013). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. *PLoS ONE* 8: e69868.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

algoritmos, 4, 5, 7, 8, 12, 16, 17  
genéticos, 4

### B

bactérias, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 53, 54, 56, 57,  
60, 73, 76, 79, 80  
bioinformática, 1, 3, 4, 5, 9, 12, 13, 14, 17, 37,  
56, 64  
biologia computacional, 5

### C

COVID-19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 33, 37, 38, 39,  
40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

### D

de novo, 10, 11, 12, 15, 17, 18, 19, 24  
DNA, 4, 5, 52, 85

### F

fármaco, 39, 40, 42, 43, 47  
fase, 23, 65

### G

genoma, 9, 10, 14, 23, 24, 38, 58

### K

kefir, 54, 55, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72,  
73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 85  
KEGG, 13

### L

*Lactobacillus*, 21, 25, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 54, 56,  
58, 59, 60, 61, 62, 66, 68, 71, 72, 73, 74, 75,  
76, 81, 82, 83

### M

metagenoma, 11, 52, 53, 54, 57  
metatranscriptoma, 7, 8, 9, 11, 14, 16, 51, 52, 53,  
54, 55, 57, 58, 59, 60, 85  
microbioma, 7, 8, 9, 10, 12, 17, 21, 51, 53, 54,  
55, 57, 59, 60, 75, 81  
mutagênese, 39

### P

probiótico, 22, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 54, 64, 65,  
66, 68, 69, 70, 71, 76, 77, 80  
proteômica, 60

### R

*reads*, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 54  
Remdesivir, 21, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45,  
46, 47, 48, 49  
RNA-seq, 18, 19, 63

### U

URI, 23, 27, 28, 30, 31, 32, 33

### V

vírus, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 32, 33, 37, 38, 39,  
44, 47, 52, 56, 58

## SOBRE O ORGANIZADOR

**Diego Lisboa Rios** 



Graduado em Ciências Biológicas, Matemática, Análise e Desenvolvimento de Sistemas e Zootecnia, com formação complementar em Administração e Marketing, pela Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Pós-graduação *lato sensu* em Gestão e Docência no Ensino Superior pela Faculdade de Teologia e Ciências Humanas - FATECH. Mestrado em Biologia Molecular no curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de São João del Rei - UFSJ, onde desenvolveu projetos relacionados a síntese translesão do DNA, expressão e purificação de proteínas recombinantes. Doutorado pela Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração: Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia, na Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, onde desenvolveu projeto de metatranscriptoma das bebidas de kefir de água e leite do Brasil e Argentina. Hoje residente de pós-doutorado na Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG. Fluente na língua inglesa, possui conhecimento avançado em informática, Big Data, programação na linguagem Python, R e MySQL.



ISBN 978-658831954-3



**Pantanal Editora**  
Rua Abaete, 83, Sala B, Centro. CEP: 78690-000  
Nova Xavantina – Mato Grosso – Brasil  
Telefone (66) 99682-4165 (Whatsapp)  
<https://www.editorapantanal.com.br>  
[contato@editorapantanal.com.br](mailto:contato@editorapantanal.com.br)