

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPG CBIOL

Dissertação

**Caracterização
preliminar da microbiota
fecal de mulheres no
climatério**

Thayane Christine Alves da Silva

Ouro Preto
2021



UFOP

THAYANE CHRISTINE ALVES DA SILVA

Caracterização preliminar da microbiota fecal de mulheres no climatério

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica estrutural e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota

Ouro Preto, MG – Brasil

Julho / 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586c Silva, Thayane Christine Alves da .
Caracterização preliminar da microbiota fecal de mulheres no
climatério. [manuscrito] / Thayane Christine Alves da Silva. - 2021.
116 f.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Microbiota. 2. Climatério. 3. RNA Ribossômico . I. Cota, Renata
Guerra de Sá. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.2

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



FOLHA DE APROVAÇÃO

Thayane Christine Alves da Silva,

Caracterização preliminar da microbiota fecal de mulheres no climatério

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular

Aprovada em 13 de julho de 2021

Membros da banca

Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Prof. Dr. Aristóteles Góes-Neto (Universidade Federal de Minas Gerais)
Prof.a Dra. Sílvia de Paula Gomes (Universidade Federal de Ouro Preto)

Profa Dra Renata Guerra de Sá Cota, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 13/09/2021



Documento assinado eletronicamente por **Renata Guerra de Sá Cota, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/09/2021, às 21:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0220461** e o código CRC **C681B7CA**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conduzir o meu caminho, por me capacitar e me sustentar em meio as dificuldades. A minha fé e coragem me trouxeram até aqui.

À minha mãe por ser a minha fonte de inspiração, por me apoiar incondicionalmente, ser a minha maior incentivadora e por me dedicar tanto amor.

Ao Madson meu amado irmão por ser meu melhor amigo, trazer alegria e luz na minha vida. Obrigado por seu cuidado, seu amor e por ser a minha pessoa no mundo todo. Ao Rafael por mostrar a beleza que é o exercício da profissão de ensinar. À minha querida tia Eliene por todo apoio que me deu e por ser o exemplo de uma das mulheres mais fortes com quem eu aprendo todos os dias.

À professora Renata minha querida orientadora agradeço todos os seus ensinamentos, conselhos, agradeço por acreditar em meu potencial quando eu mesma duvidava. Sua excelente orientação me transformou como profissional e como pessoa. Serei eternamente grata por termos caminhado juntas nessa jornada.

Agradeço à professora Angélica, ao projeto Âmbar pelo trabalho em conjunto. Agradeço ao Lauro pelo suporte durante as análises do meu projeto.

Aos meus queridos amigos do LBBM Yuri, Jennefer e Flávia vocês estiveram comigo desde o início. Trouxeram alegria nos dias de experimento, nas nossas tardes de café, e apoio nos momentos de maior dificuldade, obrigada por estarem ao meu lado.

Agradeço a Sílvia por trazer conselhos sábios, a Alzira por toda colaboração e carinho. Agradeço a Débora por ter me apresentado ao LBBM, aos aprendizados que tive com Natália, Luciene e Ester. Agradeço a Daiane e Isabela que mesmo de longe foram incríveis, pacientes, e excelentes em dividir o conhecimento comigo. Meu carinho e agradecimento a todos vocês da família LBBM.

Aos amigos que eu ganhei quando cheguei a UFOP: Frederico, Ana, Eloan, Túlio, Débora, Camila, Flávio e Marcos. Obrigada por todas as boas risadas (que foram muitas), por cuidarmos e apoiarmos uns aos outros. Agradeço a Ana Beatriz e Isabela por nossas folgas em casa dividindo pizzas ou cozinhando, bons momentos que sempre serão recordados.

À Jéssica minha grande amiga, por me acolher, me ouvir, aconselhar, por viver intensamente esse momento comigo, toda minha admiração e carinho pela nossa amizade. Agradeço à Luciana e a Cíntia pelo carinho, compreensão e cumplicidade, nossa amizade é maior que qualquer distância e tempo que passamos sem nos encontrar. Obrigada Letícia e Raphaela por me visitarem e transformar os nossos passeios em Ouro Preto.

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e a todos os profissionais que dele fazem parte. A estrutura da UFOP, NUPEB, LAPAC pelo suporte durante o mestrado. As agências de Fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro para execução desse projeto.

Minha sincera gratidão a todos aqueles que comigo dividiram experiências, conhecimentos e contribuíram para que eu pudesse concluir essa importante etapa da minha vida.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

Durante o climatério ocorrem mudanças hormonais, bioquímicas e metabólicas que podem alterar a qualidade de vida da mulher. A microbiota intestinal vem sendo investigada por também sofrer modificações conforme a faixa etária e condições hormonais encontradas no organismo feminino. A busca por uma microbiota intestinal equilibrada vem sendo debatida sob diversas perspectivas e associada a condições de saúde ou doença, o que ainda é pouco relatado na fase do climatério. Objetivo: Identificar a microbiota intestinal de uma coorte de mulheres em fase de climatério na cidade de Ouro Preto – MG e correlacionar com a presença de alterações nos padrões bioquímicos e hormonais dessa coorte. Métodos: Foram selecionadas 70 mulheres com idades entre 40 a 65 anos em fase de climatério, distribuídas em três grupos conforme critério STRAW para envelhecimento reprodutivo. Reprodutivo (n=11) Pré menopausa (n=15) e Pós menopausa (N= 44). Foram realizadas entrevistas, coletas de sangue para avaliações bioquímicas e hormonais. A microbiota intestinal foi avaliada a partir de amostras fecais por qPCR onde foram analisados quatro gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*. Nove amostras desse grupo foram analisadas por sequenciamento do gene RNA ribossomal (16SrRNA) através da tecnologia Illumina. Resultados: Parâmetros bioquímicos que apresentaram diferença entre os três grupos foram Ureia, cálcio e ácido úrico ($p < 0,05$). A qPCR indicou que o gênero *Clostridium* era o mais abundante em todos os três grupos e apresentava diferença significativa entre grupo Reprodutivo e Pós menopausa ($p = 0,0003$). Encontrada uma correlação para *Bifidobacterium* e FSH ($r = 0,642$ p valor: 0,0372), *Bacteroides* e FSH ($r = 0,656$ p valor: 0,0322), *Lactobacillus* e cálcio ($\rho = 0,526$ p valor: 0,0438). A análise do sequenciamento indicou 13 gêneros mais abundantes: *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Agathobacter*, UCG-002, *Christensenellaceae*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Subdoligranulum*, *Dialister*, *Eubacterium coprostanoligenes*, *Escherichia-Shigella*, *Blautia*, UCG-005, bem como os metabólitos possíveis reforçando a hipótese de que a composição da microbiota afeta os parâmetros glicometabólicos e hormonais. Em conjunto podemos concluir que as mudanças hormonais e glicometabólicas no climatério na população estudada é acompanhada por alteração significativa na microbiota fecal em relação ao gênero *Clostridium* e esse estudo contribui para uma visão preliminar acerca da composição da microbiota intestinal no climatério, abrindo uma ampla perspectiva para novos estudos.

Palavras chaves: Microbiota; Climatério; Menopausa; RNA ribossomal 16S; qPCR; Sequenciamento.

ABSTRACT

Hormonal, biochemical, and metabolic changes during the climacteric period may alter the quality of life of women. The intestinal microbiota changes due to age and hormonal conditions found in the female utilize fecal samples for such investigation. The pursue of a balanced intestinal microbiota has been discussed from many perspectives. That is why it has been associated with health or disease conditions, which remain poorly understood under the climacteric phase. Thus, this study aimed to identify the fecal microbiota other than biochemical and hormonal parameters of a cohort of women at the climacteric phase in the city of Ouro Preto – MG, Brazil. 70 women aged from 40 to 65 years old at the climacteric stage were recruited and distributed into three groups according to STRAW criteria for reproductive aging: reproductive (n=11), premenopausal (n=15), and postmenopausal (n=44). All women responded to a questionnaire whereas blood samples were collected for biochemical and hormonal characterization. The intestinal microbiota was analyzed from fecal samples by qPCR through the genera *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, and *Clostridium*. Nine samples from this group had the ribosomal RNA (16SrRNA) sequenced by Illumina technology. Results: All following biochemical parameters showed differences among the three groups: urea, calcium, and uric acid ($p < 0.05$). The qPCR findings revealed the genus *Clostridium* as the most abundant in all three groups with a significant difference between Reproductive and Post-menopausal groups ($p = 0.0003$). In addition, a correlation was found for *Bifidobacterium* and FSH ($r = 0.642$ p-value: 0.0372); *Bacteroides* and FSH ($r = 0.656$ p-value: 0.0322) and *Lactobacillus* and calcium ($\rho = 0.526$ p-value: 0.0438). The 13 most abundant genera showed by sequencing analysis were *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Agathobacter*, *UCG-002*, *Christensenellaceae*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Subdoligranulum*, *Dialister*, *Eubacterium/coprostanoligenes*, *Escherichia-Shigella*, *Blautia*, and *UCG-005*. Take together we can conclude that the climacteric, hormonal and glycometabolic changes in the climacteric in the studied population are accompanied by a significant change in the fecal microbiota in relation of the genus *Clostridium* and that this study contributes to a preliminary view of the composition of the intestinal microbiota in the climacteric phase, opening a broad perspective for news studies.

Key words: Microbiota; Climacteric; Menopause; 16S ribosomal RNA; qPCR; Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios do Envelhecimento Reprodutivo sistema de estadiamento para o envelhecimento reprodutivo em mulheres.....	20
Figura 2: Fluxograma para realização do estudo	39
Figura 3: Curva padrão gerada a partir dos pontos de Ciclo Treshold obtidos com a amplificação de diferentes concentrações de DNAG	44
Figura 4: Frequência (%) de mulheres em fase reprodutiva que apresentaram sintomas na escala MRS.....	49
Figura 5: Frequência (%) de mulheres em pré menopausa que apresentaram sintomas na escala MRS.....	49
Figura 6: Frequência (%) de mulheres pós menopausa que apresentaram sintomas na escala MRS.....	50
Figura 7: Análise da qualidade do DNAG extraído de amostras fecais.....	52
Figura 8: Quantificação de bactérias por qPCR a partir de amostras fecais de mulheres no climatério	53
Figura 9: Quantificação por qPCR dos gêneros <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Clostridium</i> a partir de amostras fecais de mulheres no climatério.....	54
Figura 10: Percentual dos gêneros <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Clostridium</i> na população total avaliada.....	55
Figura 11: Percentual dos gêneros <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Clostridium</i> nos estágios reprodutivo (a), pré menopausa (b) e pós menopausa (c).....	56
Figura 12: Representação comparativa dos gêneros <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Clostridium</i> dentre os estágios de envelhecimento reprodutivo	57
Figura 13: Representação esquemática da composição da microbiota fecal a nível de gênero nas amostras analisadas por sequenciamento.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das mulheres de acordo com os estágios de envelhecimento reprodutivo e status menopausal.	47
Tabela 2: Caracterização sociodemográfica e comportamental das participantes.	48
Tabela 3: Parâmetros bioquímicos obtidos para os grupos reprodutivo, pré menopausa e pós menopausa.	50
Tabela 4: Parâmetros hormonais avaliados para os grupos reprodutivo, pré menopausa e pós menopausa.	51
Tabela 5: Análise de correlação entre os gêneros bacterianos quantificados por qPCR e as variáveis bioquímicas dos grupos reprodutivo, pré menopausa e pós menopausa.....	58
Tabela 6: Número de reads totais gerados por amostra provenientes do sequenciamento	59
Tabela 7: OTUs identificadas e sua distribuição conforme o nível taxonômico.....	59
Tabela 8: Gêneros bacterianos que foram encontrados mais frequentes nos grupos pré menopausa e pós menopausa.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Terminologias e definições de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e Sociedade Internacional de Menopausa (IMS).....	18
Quadro 2: Sequência de Primers utilizados para amplificação dos gêneros Bifidobacterium, Bacteroides, Lactobacillus, Clostridium.....	42
Quadro 3: Predição das vias metabólicas encontrados no KEGG presentes nas amostras sequenciadas	62
Quadro 4: Predição das enzimas encontradas no KEGG presentes nas amostras sequenciadas	62

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA: RNA ribossomal 16S

AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta

CT: Ciclo Treshold

DCV: Doenças Cardiovascular

DMO: Densidade Mineral Óssea

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FMP: Período Menstrual Final

FSH: Hormônio Folículo estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

GSM: Síndrome Geniturinária

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL-c: Lipoproteína de alta densidade

HMP: Projeto Microbioma Humano

IBD: Doença Inflamatória Intestinal

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade

LH: Hormônio Luteinizante

LPS: Lipopolissacarídeo

MRS: Menopausal Rate Scale

NGS: Sequenciamento de Nova Geração

OMS: Organização Mundial da Saúde

OTUs: Unidades Taxonômicas Operacionais

PAISM: Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SM: Síndrome Metabólica

STRAW: *Stages of Reproductive Aging Workshop*

SUS: Sistema único de Saúde

TBE: Tris/borato/EDTA

TCLE: Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TG: Triglicerídeos

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Uma fase denominada Climatério.....	17
2.2 Conceitos e definições para as fases que o climatério abrange	18
2.3 Alterações hormonais precedentes do envelhecimento ovariano	20
2.4 Impactos no organismo da mulher após o climatério	22
2.5 Avaliando a qualidade de vida por meio dos índices menopausais.....	24
2.6 Tratamentos e terapias utilizadas no climatério.....	25
2.7 Microbiota	26
2.8 Funções da microbiota intestinal	28
2.9 Disbiose Intestinal.....	28
2.10 Probióticos e Prébióticos	31
2.11 Microbiota intestinal e suas ações no climatério.....	31
2.12 Uso de ferramentas ômicas no estudo da microbiota intestinal	34
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo Geral	37
4.2 Objetivos Específicos	37
5 MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 Aspectos éticos	38
5.2 Delineamento do estudo	38
5.3 Critérios de exclusão	39
5.4 Entrevista	39
5.5 Análise do perfil bioquímico e hormonal	40
5.6 Coleta de Fezes.....	40
5.7 Extração de DNA	41
5.8 Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	42
5.9 Quantificação dos gêneros bacterianos por PCR em tempo real (qPCR).....	43
5.10 Sequenciamento de Nova Geração.....	44
5.11 Análise dos dados sequenciados	45

5.12 Controle de qualidade	45
5.13 Análise das sequencias obtidas e classificação taxonômica	45
5.14 Classificação metabólica funcional <i>in silico</i>	45
5.15 Análises estatísticas	46
6 RESULTADOS.....	47
6.1 Caraterização da amostra.....	47
6.2 Escala de avaliação de menopausa (MRS)	48
6.3 Análises dos parâmetros bioquímicos.....	50
6.4 Análise dos parâmetros hormonais.....	51
6.5 Integridade e qualidade do DNAg extraído de amostras fecais	52
6.6 Quantificação dos gêneros bacterianos através de qPCR.....	52
6.7 Correlação entre os gêneros e parâmetros bioquímicos	57
6.8 Caracterização preliminar do microbioma fecal de mulheres utilizando abordagem metagenômica	58
6.9 Predição Metabolômica.....	61
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÃO.....	76
9 PERSPECTIVAS	77
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
11 ANEXOS.....	92
11.1 ANEXO A: APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	92
11.2 ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	94
11.3 ANEXO C: FICHA CLÍNICA CLIMATÉRIO.....	96
11.4 ANEXO D: MENOPAUSE RATING SCALE (MRS)	97
11.5 ANEXO E : Curva Padrão utilizando <i>Primer 16S rRNA</i> para quantificar cópias de DNA bacteriano.....	98
11.6 ANEXO F: Número de cópias de DNA bacteriano quantificado por qPCR utilizando <i>Primer 16S rRNA</i> para os gêneros <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridium</i>	99

1 INTRODUÇÃO

A transição fisiológica do período reprodutivo para o não reprodutivo na mulher é denominada climatério. Nessa fase se destacam as alterações hormonais que se relacionam com aparecimento de sinais e sintomas vasomotores, urogenitais, cognitivos e psicológicos (BRASIL,2008). Também tem sido descrito a ocorrência de desordens metabólicas como obesidade, diabetes mellitus, aumento do risco de doenças cardiovasculares e alterações do tecido ósseo nesse período (SOBRAC, 2013).

Foi demonstrado que a microbiota intestinal, conjunto de bactérias que habitam o intestino, são influenciadas por alterações dos hormônios sexuais femininos ao passo que elas também impactam de maneira significativa os níveis de estrogênios (FLORES *et al.*, 2012) que na fase de climatério tem um decaimento significativo.

O intestino abriga em torno de 100 trilhões de microrganismos que desempenham funções importantes para a saúde humana. Quando se instala um processo de disbiose dessa microbiota intestinal podem ocorrer processos inflamatórios, má absorção de nutrientes, o que contribui para o aparecimento de doenças metabólicas e imunológicas (KRISSE *et al.*, 2018).

Na última década houve uma expansão nas pesquisas para conhecer a composição da microbiota intestinal e sua relação com processos de saúde e doença nos seres humanos. O Projeto Microbioma Humano (HMP) caracterizou a microbiota de 300 indivíduos, já o MetaHit catalogou 3 milhões de genes presentes no metagenoma intestinal (BIELANSKI; HABER, 2012; LI *et al.*, 2014). A busca do que seria uma microbiota intestinal saudável vem sendo debatida sob diversas perspectivas, estudos tem associado gêneros e suas espécies a obesidade, diabetes, doenças gastrintestinais, alergias dentre outras (BHATTARAI; MUNIZ PEDROGO; KASHYAP, 2017; MACHIELS *et al.*, 2014). O que já é consenso é que a microbiota intestinal tem uma assinatura para cada indivíduo, ela se altera conforme a fase da vida e pode ser modulada por diversos fatores como: dieta consumida, etnia, prática de exercício físico, uso de antibióticos (RINNINELLA *et al.*, 2019).

Mulheres em fase de climatério tem sua microbiota vaginal bem descrita na literatura, porém ainda são reduzidos os estudos inferidos sobre sua microbiota intestinal. Compreende-se que há um conjunto de bactérias intestinais capazes de metabolizar os estrogênios o que vai influenciar nos seus níveis circulantes (KWA *et al.*, 2016) e em doenças relacionadas ao estrogênio como obesidade, doenças cardiovasculares, osteoporose e câncer de mama (BAKER; AL-NAKKASH; HERBST-KRALOVETZ, 2017; YANG *et al.*, 2015).

Para compreender essas relações microbiota-hospedeiro vem sendo empregado o uso de técnicas moleculares e de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), que utilizam o gene RNA ribossomal 16S marcador universal bacteriano para identificação filogenética da microbiota.

A amplificação pela técnica de Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) tem sido muito utilizada em ensaios que desejam relatar a composição e quantificação bacteriana na microbiota intestinal a partir de amostras fecais. Para tal experimento devem ser padronizadas condições relacionadas aos protocolos de extração, primers utilizados, condições de termociclagem para que não subestimem táxons bacterianos (KLINDWORTH *et al.*, 2013; KOOK *et al.*, 2018; SANTOS, 2016). A abordagem metagenômica também é muito utilizada, após o sequenciamento o volume de dados gerados é grande e necessita de análises de bioinformática que resultarão na composição taxonômica dessas bactérias e suas funções preditas (KNIGHT *et al.*, 2018).

Técnicas de NGS são padrão ouro para identificar com profundidade os táxons de diversas espécies, todavia ainda apresentam investimento financeiro maior, demanda estrutura física especial e conhecimento por exemplo de bioinformática. Técnicas moleculares para diagnóstico baseado em kits como por exemplo a qPCR identificam bactérias em níveis taxonômicos menores, porém são mais acessíveis em comparação com NGS, possuem custo menor permitindo seu uso para pesquisas independentes e que não possuem estrutura e maquinário de sequenciamento (BIKEL *et al.*, 2015).

Conhecer a composição e compreender o funcionamento da microbiota intestinal juntamente com a homeostase do organismo humano tem incitado a ciência no presente momento. Um desafio da medicina personalizada é avaliar a microbiota intestinal de cada indivíduo e sua resposta ao meio, utilizando-a como possível marcador para algumas patologias ou para instruir o tratamento de acordo com as particularidades de cada pessoa. Buscar uma microbiota intestinal indicadora de saúde ou de doença se mostra como uma perspectiva presente e promissora na pesquisa e diagnóstico clínico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Uma fase denominada Climatério

As mulheres experienciam ao longo de sua vida diversas mudanças relacionadas a sua qualidade de vida e saúde, e uma delas é o advento do climatério e subsequentemente a menopausa. O climatério é definido como uma fase biológica da vida e não um processo patológico, é um evento fisiológico que compreende a transição entre o período reprodutivo para o não reprodutivo da mulher. Nessa fase tem-se a ocorrência da menopausa que é caracterizada pelo último ciclo menstrual, seguido por doze meses consecutivos sem nenhuma ocorrência de episódio menstrual (BRASIL, 2008).

O climatério tem o seu início em torno dos 40 aos 65 anos de idade e a menopausa natural ocorre em média por volta de 51 anos (SOBRAC,2013). Alguns estudos ainda mostram que pode ocorrer a chamada menopausa prematura que acontece antes dos 40 anos de idade, ou a menopausa precoce ocorrida por volta 45 anos (SHUSTER *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2019). O climatério além de ser influenciado por fatores hormonais, recebe influência de fatores genéticos, ambientais, socioculturais e étnicos. Fatores esses que podem induzir tipos diferentes de respostas do organismo feminino as mudanças dessa fase (CHAN; GOMES; SINGH, 2020; O'NEILL; EDEN, 2012; ZHANG *et al.*, 2016).

Os recentes dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde (2019) mostram que a média global da expectativa de vida para mulheres é de 76 anos de idade. No Brasil de acordo com o último censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, as mulheres são maior número na população (51,1%) e apresentam expectativa de vida de 78,1 anos (IBGE, 2010) esses índices demonstram que a mulher vive mais tempo e consequentemente passará em torno de 1/3 da sua vida sob as condições de pós menopausa (BRASIL, 2008).

No estado de Minas Gerais 50,8% da população são mulheres, já na cidade de Ouro Preto esse índice aumenta e a população feminina totaliza 51,3%. Analisando a população feminina em Ouro Preto 37,3% estão acima dos 40 anos de idade, faixa etária onde ocorre o início do climatério (IBGE, 2010).

No Brasil a assistência à saúde da mulher é preconizada pelo Ministério da Saúde e exercida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) que orienta a população e os profissionais de saúde acerca do auxílio para a mulher. Em 1984, o Ministério da Saúde desenvolveu o Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher (PAISM) cujo enfoque primário era assistir mulheres em fase reprodutiva, no puerpério e na anticoncepção (BRASIL, 1986). Em 1993 foi incluído

nesse documento orientações voltadas para o climatério visando a melhoria e humanização do atendimento a mulheres nessa fase (BRASIL, 2004).

Executando um dos objetivos do PAISM o Ministério da Saúde elaborou o “Manual de atenção integral à saúde da Mulher no climatério/menopausa” em 2008. Um manual confeccionado para qualificar o atendimento e atenção à saúde da mulher no climatério. O manual mantém os princípios elementares para a atenção em saúde e conceitua aspectos emocionais, psicológicos, da sexualidade e as modificações hormonais que se destacam nessa fase (BRASIL, 2008), descrevendo também medidas preventivas e promotoras da saúde para uma melhor qualidade de vida da mulher.

2.2 Conceitos e definições para as fases que o climatério abrange

À medida que a pesquisa clínica e o cuidado com a saúde da mulher foram se expandindo, verificou-se falha nas terminologias comumente utilizadas na definição de menopausa entre os pesquisadores, corpo clínico e a população (UTIAN, 2004).

No ano de 1976 foi realizado o primeiro Congresso Internacional da Menopausa, para esclarecer termos relacionados ao climatério e menopausa. Em 1980 o grupo científico de pesquisa em Menopausa da Organização Mundial da Saúde contribuiu com as definições que foram revisadas em 1994 e logo publicadas em 1996 (WHO SCIENTIFIC GROUP ON RESEARCH ON THE MENOPAUSE, 1981, 1996). A Sociedade internacional de menopausa se reuniu então em 1999 com intuito de complementar as recomendações já inseridas pela OMS anteriormente as quais são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1: Terminologias e definições de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e Sociedade Internacional de Menopausa (IMS)

Terminologia	Definição
Menopausa (natural)	Interrupção definitiva da menstruação decorrente da perda da atividade folicular ovariana. Ocorre com o período final da menstruação (FMP) seguido por 12 meses consecutivos de amenorreia sem causa patológica.
Perimenopausa	Período imediatamente anterior a menopausa (Início das mudanças endocrinológicas, biológicas e clínicas da menopausa) e o primeiro ano após a menopausa

Transição da menopausa	Deve ser utilizado para o período de tempo antes do FMP, quando ocorre maior oscilação no ciclo menstrual.
Climatério	É a fase do envelhecimento das mulheres. Transição da fase reprodutiva para fase não reprodutiva.
Síndrome do climatério	Quando o climatério é associado a sintomatologia.
Pré-menopausa	Recomendado uso para se referir a todo o período reprodutivo antes da menopausa. Abrangendo todo o período reprodutivo até o período menstrual final (FMP).
Pós- menopausa	Definição usada a partir do período menstrual final, independente se a menopausa foi induzida ou espontânea.

Fonte: (UTIAN, 1999; WHO SCIENTIFIC GROUP ON RESEARCH ON THE MENOPAUSE, 1996)

Outro marco importante para esclarecimentos sobre climatério foi a realização do Workshop de Estágios do Envelhecimento Reprodutivo em 2001 (STRAW) que detinha o objetivo de propor uma nomenclatura e um sistema de classificação para o envelhecimento ovariano, adotando critérios hormonais menstruais e qualitativos para definir cada estágio (SOULES *et al.*, 2001). Com o progresso dos estudos sobre o tema, em 2011 foi realizado na cidade de Washington o Workshop de acompanhamento denominado “STRAW+10” que reavaliou os avanços anteriormente alcançados e atualizou os critérios do STRAW.

Diversos pesquisadores avaliaram em conjunto critérios como ciclos menstruais: Hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol, inibina-B, sintomas, fertilidade e imagem ovariana. Após a revisão do primeiro documento STRAW foram incluídas recomendações e definições específicas dos estágios da vida reprodutiva. A finalidade dessa atualização foi melhorar e disponibilizar uma base sólida para que os pesquisadores e profissionais da saúde possam classificar adequadamente o status de envelhecimento ovariano de mulheres (HARLOW *et al.*, 2012).

O STRAW é considerado padrão ouro para definições referentes ao envelhecimento reprodutivo feminino e para sedimentar os critérios do STRAW e STRAW+10 foram utilizados grandes estudos de coorte da população: Estudo de saúde da mulher (SWAN), TREMIN, Projeto de saúde de mulheres de meia-idade de Melbourne (MWMHP), Estudo de saúde da mulher de meia-idade de Seattle (HARLOW *et al.*, 2006, 2008; RANDOLPH *et al.*, 2011). Como resultado do workshop de 2011 a vida adulta feminina foi classificada em fase reprodutiva, transição da menopausa e pós menopausa. Considerou-se o período menstrual final

(FMP) como etapa 0, a partir daí foram definidas as seguintes subdivisões: Fase reprodutiva em início, pico e final (-5/ -4/ -3), fase de transição da menopausa estágio -2 (precoce) e estágio -1 (tardia), fase de pós menopausa +1 precoce (+1a/ +1b/ +1c) e tardia +2 representadas na figura 1 (HARLOW *et al.*, 2012).

Figura 1: Estágios do Envelhecimento Reprodutivo sistema de estadiamento para o envelhecimento reprodutivo em mulheres.

Estágio	-5	-4	-3b	-3a	-2	-1	+1a	+1b	+1c	2
Terminologia	Reprodutiva				Transição Menopausal		Pós Menopausa			
	Precoce	Máxima	Tardia		Precoce	Tardia	Precoce			Tardia
Duração	Variável				Variável	1-3 anos	2 anos (1+1)		3-6 anos	Vida útil remanescente
CRITÉRIO PRINCIPAL										
Ciclo Menstrual	Variável a regular	Regular	Regular	Mudanças sutis no fluxo/duração	Duração Variável Diferença persistente ≥7 dias na duração de ciclos consecutivos	Intervalo de amenorreia 60 dias				
CRITÉRIO DE SUPORTE										
ENDÓCRINAS										
FSH			Normal	Variável	↑Variável*	↑>25 UI/L**	↑Variável*	Estabiliza		
AMH			Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Muito baixo		
INIBINA B			Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Muito baixo		
Contagem de folículos antrais 2-10mm			Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Muito baixo	Muito baixo		
CARACTERÍSTICAS DESCRITIVAS										
SINTOMAS						Prováveis sintomas Vasomotores	Sintomas vasomotores mais prováveis			Aumento dos sintomas de atrofia urogenital
Legenda: * = coleta de sangue do 2° ao 5° dia do ciclo ↑ = Níveis elevado ** = Nível esperado aproximado com base em ensaios utilizando os padrões hipofisários										

Fonte: Adaptado de (HARLOW *et al.*, 2012)

2.3 Alterações hormonais precedentes do envelhecimento ovariano

O climatério envolve mudanças físicas, psicológicas e principalmente mudanças nos hormônios, que são comumente usados como um dos critérios para definir qual a fase do

climatério que a mulher se encontra e recebem um grande destaque por influenciarem a saúde feminina (FEBRASGO, 2010).

Ao seu nascimento toda mulher já tem definido o número de folículos ovarianos que utilizará em toda sua vida e no decorrer dos seus anos reprodutivos são produzidos hormônios que modulam o ciclo menstrual e reprodutivo, podendo ser indicados os hormônios de origem hipofisária: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), e os denominados hormônios de origem ovariana: Progesterona e Estrogênio (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Como descrito por Selgrade *et al.* (2009) o ciclo menstrual da mulher em idade reprodutiva é dividido em fase folicular e fase lútea sendo separadas pelo processo de ovulação. Para que haja a regulação desse ciclo ocorre uma interação dos hormônios sintetizados pelo hipotálamo, pela hipófise e pelos ovários.

Em um ciclo menstrual regular o hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que age sobre a hipófise estimulando-a produzir o FSH e LH direcionados ao desenvolvimento do folículo presente no ovário. Com o crescimento folicular ocorre também o aumento dos níveis de estrogênio, principalmente β - estradiol, o qual fornece um feed-back negativo ao hipotálamo e a hipófise causando a cessação da liberação de FSH e LH caracterizando a fase folicular. Quando o organismo atinge o pico de LH ocorre a ovulação pois o folículo ovariano é rompido transformando-se em corpo lúteo, nesse momento observa-se o aumento de progesterona e queda de estrogênio representando a fase lútea do ciclo. Com o fechamento do ciclo pode ocorrer a gestação, se o ovócito for fecundado, ou a descamação do endométrio conhecida também como menstruação (BURGER *et al.*, 2007; HOLESCH; BASS; LORD, 2021; ROUDEBUSH; KIVENS; MATTKE, 2008).

Os ovários também são responsáveis pela produção de diversos hormônios como relaxina, inibina A, inibina B, ativina e hormônio antimulleriano (AMH) importantes para todo o ciclo hormonal da mulher. Com o envelhecimento, a mulher passa por um processo denominado transição menopausal que marca o início do climatério, onde aumenta a variabilidade e duração do ciclo menstrual, e isso ocorre de um a cinco anos antes da menopausa propriamente consumada. A irregularidade dos ciclos menstruais está ligada a um declínio das funções ovarianas, e conseqüentemente ao seu esgotamento (O'CONNOR; HOLMAN; WOOD, 2001).

A transição tem seu início a partir da diminuição crítica de folículos ovarianos que exercem influência na comunicação hipotálamo-hipófise-ovário. A hipófise sob estímulo prévio do hipotálamo é responsável por secretar o FSH e LH que por sua vez regulam a função ovariana induzindo o amadurecimento dos folículos que estão viáveis, essa maturação leva

produção de estradiol um hormônio esteroide, e a produção de inibina B, um hormônio peptídico e ambos desempenham funções de sinalização para o hipotálamo- hipófise inibindo a produção de FSH (BURGER, 2008).

O climatério e posteriormente a menopausa são eventos resultantes do decaimento dos folículos ovarianos e consequente alteração dessa comunicação, pois a inibina B secretada em níveis menores, altera a resposta enviada a hipotálamo-hipófise, que continuam com a produção de FSH, mantendo seus níveis elevados. Quando ocorre o período menstrual final (FMP) e o esgotamento folicular, a menopausa se instala mantendo níveis elevados de FSH e LH com uma posterior diminuição de estradiol e progesterona que permanecerão inalterados por toda a vida da mulher (BRASIL, 2008).

2.4 Impactos no organismo da mulher após o climatério

Muitas mulheres relatam a ocorrência de sinais e sintomas que tem seu aparecimento a partir dessa fase e podem ser descritos como transitórios que são alterações do ciclo menstrual e sintomatologia mais aguda ou não transitórios constituídos por condições de atrofia do sistema genitourinário, desordens no metabolismo de lipídeos e ósseo (SERPA *et al.*, 2016). O decaimento dos hormônios esteroides sexuais são indicados como uma das causas para os sintomas climatéricos, porém fatores relacionados à nutrição, genética, e psicossociais podem interferir na intensidade e frequência desses sintomas (FEBRASGO, 2010).

Sintomas vasomotores tem sido relatados após o início do climatério e menopausa, a ocorrência de suores noturnos e ondas de calor denominadas popularmente como fogachos, tem sido descritas como sintomas de grande ocorrência e que afetam em demasia a qualidade de vida da mulher (SANTORO; EPPERSON; MATHEWS, 2015). Esses sintomas vem sendo investigados ao longo do tempo e ao acompanhar uma coorte de mulheres por 13 anos foi identificado que as ondas de calor duram em média 10,2 anos sendo associado ao início da menopausa (FREEMAN *et al.*, 2011). Em outra análise até 80% das mulheres experimentam os sintomas vasomotores ao longo da menopausa onde a intensidade e frequência foram variáveis (GOLD *et al.*, 2006).

A causa para sintomas vasomotores ainda não é totalmente conhecida, mas sabe-se que está relacionado a alterações do centro termorregulador influenciado por flutuações nos níveis de estrogênio (FREEDMAN; KRELL, 1999). Outras condições também podem exercer influência como estilo de vida, etnia, idade, massa corporal, tabagismo, ansiedade, atividade

física, sugerindo que as ondas de calor têm origem multifatorial e não somente por alterações hormonais (AVIS; CRAWFORD; GREEN, 2018).

A síndrome geniturinária da menopausa (GSM) é a condição que envolve alterações genitais, sintomas urológicos e sexuais decorrentes do hipoestrogenismo no decorrer do climatério (GANDHI *et al.*, 2016). A queda de níveis estrogênicos contribui para alterações anatômicas e funcionais na região urogenital feminina, levando a redução da elasticidade da vagina, alteração do pH local com consequente alteração da microbiota vaginal, diminuição de lubrificação, e mais suscetibilidade á irritações físicas (KIM *et al.*, 2015; NAPPI; PALACIOS, 2014). Também estão presentes sintomas como secura vaginal, ardor, irritação, dispareunia, urgência miccional, disúria ou incontinência urinária na síndrome geniturinária na menopausa (FAUBION; SOOD; KAPOOR, 2017; KAGAN; KELLOGG-SPADT; PARISH, 2019).

O estudo multicêntrico GENISSE demonstrou que 70% das mulheres na pós menopausa possuíam diagnóstico de GSM (MORAL *et al.*, 2018), esse diagnóstico não afeta apenas a saúde física mas acarreta efeitos negativos na qualidade de vida da mulher, como mostra o estudo “Vozes da Mulher na Menopausa” onde um total de 40% das mulheres tem impacto negativo em sua vida sexual e 17 % sentem impacto negativo em sua autoestima, isso decorrente de sintomas vulvovaginais da GSM (NAPPI; KOKOT-KIEREPA, 2010).

Outro fator impactante na saúde da mulher na menopausa, são os chamados distúrbios de origem metabólica. São destacadas as desordens relacionadas ao metabolismo de glicose e resistência à insulina que podem acarretar diabetes mellitus, dislipidemias, obesidade visceral, doença cardiovascular (DVC) e a associação desses fatores contribui para que a mulher desenvolva a condição de síndrome metabólica (SM) (MEIRELLES, 2014).

A presença de dislipidemias com altas concentrações de colesterol total, triglicérides e lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), está associado ao risco de desenvolver doenças cardiovasculares (ANAGNOSTIS *et al.*, 2020). De acordo com Pardhe *et al.*, (2017) o estrogênio possui efeitos cardioprotetores atuando no controle dos níveis lipídicos no organismo dentre outros mecanismos e durante a menopausa a mulher perde esse efeito protetor isso contribui para um aumento no risco de doenças cardiovasculares.

A ocorrência de resistência insulínica, obesidade por acúmulo de gordura visceral, e diabetes de forma simultânea contribuem para o desenvolvimento da Síndrome metabólica nas mulheres menopausadas (GASPARD, 2009; MEIRELLES, 2014). A hipertensão arterial (HAS) também exerce papel importante, pois como descrito por Beaufile (2006) a incidência de HAS aumenta em mulheres após a menopausa.

Após o estabelecimento da menopausa fica destacada maior prevalência de Síndrome metabólica segundo PU *et al.*, (2017), e a literatura discorre ainda sobre essa prevalência estar ocorrendo mais na pós menopausa (BEN ALI *et al.*, 2014; FIGUEIREDO NETO *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2019). Importante ressaltar que na cidade de Ouro Preto um estudo anterior demonstrou prevalência de síndrome metabólica em 46% de mulheres climatéricas (GOUVEA, 2016).

Outra condição recorrente é a baixa densidade mineral óssea (DMO) que é uma redução de tecido ósseo por alterações na sua microarquitetura que pode levar a osteoporose (RADOMINSKI *et al.*, 2017). Milhões de mulheres são afetadas pela osteoporose em todo o mundo e essa condição se associa com morbidade, mortalidade, reduz a qualidade de vida, aumenta a ocorrência de fratura e influência em maiores custos com a saúde (GARCÍA-GOMÁRIZ *et al.*, 2018).

Outros sintomas apresentados durante o climatério envolvem problemas cognitivos como redução na atenção, declínios na memória, sintomas de depressão, ansiedade, distúrbios do sono, irritabilidade, alto nível de angústia, baixa autoestima (ALI; AHMED; SMAIL, 2020; MAKI; HENDERSON, 2016). Esses sintomas podem influenciar a qualidade de vida durante climatério e há uma necessidade de maiores esclarecimentos sobre mecanismos que envolvem o seu desencadeamento nesse período.

2.5 Avaliando a qualidade de vida por meio dos índices menopausais

Para avaliar e caracterizar a intensidade dos sintomas ocorridos no climatério foram validados instrumentos utilizados extensivamente na pesquisa e na prática clínica. São ferramentas que quantificam os sintomas e auxiliam na avaliação da qualidade de vida, além de nortear a eficácia de tratamentos propostos nesse período. Os índices principais utilizados para essa finalidade são: índice de Kupperman (IK) (KUPPERMAN *et al.*, 1953), Escala Climatérica de Greene (ECG) (GREENE, 1999), *Menopause Rating Scale* (MRS) (HAUSER *et al.*, 1994).

O índice utilizado neste trabalho foi o MRS (ANEXO D) formulado em 1992 por Hauser (1994) e validado por Heinemann (2004) e Potthoff (2000). O MRS possui 11 itens descritos que englobam sintomas psicológicos, somático e urogenital. Cada um dos sintomas pode obter na escala pontuações que variam de 0 (sem sintomas) até 4 (sintomas graves). A pontuação inicia em 0 (assintomático) e aumenta ponto a ponto com o aumento da gravidade dos sintomas, podendo chegar ao score máximo 44 (maior grau de queixas). O MRS é considerado

instrumento de alto padrão metodológico padronizado, é recomendado sua aplicação para quantificar a ocorrência e variação das queixas da menopausa (POTTHOFF *et al.*, 2000).

2.6 Tratamentos e terapias utilizadas no climatério

Com a ocorrência de sintomas que trazem desconforto e prejuízo na qualidade de vida da mulher no climatério, a pesquisa clínica tem mantido seu esforço em investigar opções de tratamentos que possam ser utilizados para minimizar ou sanar o aparecimento de tantos desconfortos na menopausa. Tratamentos farmacológicos através de terapia hormonal vem sendo estudados desde a década de 1960, variando sua composição e sua combinação de hormônios de acordo com a necessidade de cada mulher (PARDINI, 2014).

A Sociedade Norte Americana de menopausa (NAMs) atualizou em 2017 as orientações para a terapia de reposição hormonal, afirmando que a terapia continua sendo tratamento eficaz para sintomas vasomotores, síndrome geniturinária e na prevenção de perda óssea (PINKERTON *et al.*, 2018). A recomendação é que o tratamento seja individualizado e pode ser feito de preferência por mulheres que possuam até 60 anos e estejam no máximo há 10 anos na menopausa, que não possuam contraindicações como câncer de mama e endométrio, doença hepática, cardiopatias, histórico de tromboembolismo (FEBRASGO, 2010).

Para minimizar os sintomas também podem ser empregadas a prática de atividade física considerada grande aliada para atenuar os sintomas que acompanham a transição da menopausa. Exercícios físicos promovem redução da gordura visceral, diminuindo risco de doenças cardiorrespiratórias e metabólicas e tem sido relatado como práticas efetivas para reduzir os sintomas menopausais (DUGAN *et al.*, 2016; JANSSEN *et al.*, 2014). Outros recursos alternativos utilizados são o uso de fitoterápicos, acupuntura e a prática de yoga tem sido citados pela literatura como opções que melhoram a qualidade de vida da mulher na redução dos sintomas como as ondas de calor, estresse, alívio da ansiedade, insônia, depressão (CRAMER; PENG; LAUCHE, 2018; EISENHARDT; FLECKENSTEIN, 2016). No Brasil a práticas integrativas e complementares em saúde (PICS) inseridas no Sistema Único de Saúde em 2006, abrangem recursos terapêuticos para prevenir doenças e recuperar a saúde. Em 2017 a lista de PICS fez a inclusão das seguintes práticas: meditação, musicoterapia, osteopatia, quiropraxia, reiki, arteterapia, e terapia comunitária integrativa (BRASIL, 2017) que podem ser empregadas no combate aos sintomas do climatério.

2.7 Microbiota

Ao longo da evolução os seres humanos estabeleceram relações simbióticas com microrganismos que habitam o corpo humano. O conjunto desses organismos é denominado Microbiota (MARCHESI; RAVEL, 2015; TURNBAUGH *et al.*, 2007) que é constituída por Vírus, Fungos, Archeas, protozoários e Bactérias que se apresentam em maior quantidade em relação aos demais componentes. A microbiota está presente em locais como pele, saliva, mucosa oral e conjuntiva, porém no trato gastrointestinal mais especificamente na região do colón, é encontrado a maior quantidade desses microrganismos aproximadamente 10^{13-14} células bacterianas (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

O trato gastrointestinal possui condições como pH, níveis de oxigênio, velocidade de trânsito intestinal que influenciam na densidade dessa colonização bacteriana. A secreção de peptídeo antimicrobiano (AMP), ácido clorídrico, muco e enzimas digestivas também se altera ao longo do trato intestinal possibilitando a colonização bacteriana (WLODARSKA; KOSTIC; XAVIER, 2015).

Os genomas provenientes desses microrganismos e as condições do local onde vivem é denominado como Microbioma (COSTA; WEESE, 2019). Esse conteúdo genético do microbioma vem sendo considerado um genoma secundário humano, pois sua quantidade excede o próprio genoma humano como mostrado em um estudo que identificou 9,8 milhões de genes microbianos intestinais em amostras humanas de três continentes, cada amostra analisada possuía cerca de 30 vezes o número de genes do genoma humano (LI *et al.*, 2014).

É durante o nascimento que os seres humanos recebem os primeiros microrganismos constituintes da sua microbiota intestinal e fatores como a idade gestacional, tipo de parto (vaginal ou cesárea), regime de alimentação (leite materno ou fórmulas), uso de antibióticos influenciam nessa colonização (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015). Um fato importante é que durante os primeiros meses de vida do bebê a amamentação com leite materno exerce efeitos protetores contra obesidade através da modulação da microbiota intestinal (FORBES *et al.*, 2018).

A composição da microbiota intestinal se modifica conforme a faixa etária, estilo de vida, uso de antibióticos, dieta, prática de exercício físico, fatores genéticos do hospedeiro, índice de massa corporal e atividades do sistema imunológico. Os seres humanos possuem uma microbiota residente também denominada indígena ou autóctone que convive harmoniosamente com o hospedeiro. Bactérias que são provenientes do ambiente e apenas passam de maneira transitória pelo trato intestinal sem se estabelecerem são chamadas de alóctones (BEAUMONT *et al.*, 2016; DAVID *et al.*, 2014; YASSOUR *et al.*, 2016).

Sua composição se dá em maior parte por bactérias que são classificadas taxonomicamente de acordo com filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies. Em um adulto saudável a microbiota intestinal é composta por filos predominantes como *Firmicutes* e *Bacteroidetes* que representam 90% da microbiota intestinal, seguido dos demais filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* (ARUMUGAM *et al.*, 2011; BIELANSKI; HABER, 2012; GOODRICH *et al.*, 2016).

A microbiota pode ser analisada através de índices de diversidade, que consideram tanto o número de diferentes táxons presente em uma comunidade quanto a sua uniformidade e proporção (COSTA; WEESE, 2019). A literatura descreve muitos desses índices como por exemplo, a diversidade α para mensurar o número de espécies presentes em uma determinada comunidade ou amostra. Também é possível utilizar a diversidade β para realizar a comparação entre as comunidades avaliadas (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012).

Grandes estudos vêm sendo realizados para caracterizar e identificar os componentes da microbiota intestinal humana. Entre os anos de 2007 e 2016 o Projeto Microbioma humano (HMP) caracterizou a microbiota de 300 indivíduos em diferentes locais do corpo disponibilizando informações de suma importância sobre a microbiota (BIELANSKI; HABER, 2012). Como parte do projeto MetaHit iniciado em 2008 LI *et al.*, (2014) e colaboradores geraram um catálogo de 3 milhões de genes presentes no metagenoma intestinal humano juntamente com suas funções.

A microbiota intestinal pode ser classificada de acordo com grupos de bactérias denominadas enterótipos são eles: *Bacteroides* (enterótipo I), *Prevotella* (enterótipo II), e *Ruminococcus* (enterótipo III). Esse agrupamento leva em consideração os diferentes gêneros bacterianos e suas funções dentro de cada enterótipo, e ele tem uma estabilidade na vida adulta podendo ser restabelecidos caso haja alguma perturbação. O enterótipo I gera energia a partir dos carboidratos utilizando vias de glicólise e pentose fosfato, enquanto os enterótipos II e III degradam glicoproteínas da camada mucosa intestinal (ARUMUGAM *et al.*, 2011).

A modificação da microbiota intestinal pode ser feita conforme o a dieta consumida, índice de massa corporal, etnia, hábitos culturais, prática de exercício físico. Todos esses fatores devem ser analisados e podem ser modificados para contribuir para a saúde do hospedeiro e da sua microbiota intestinal que é única para cada pessoa (RINNINELLA *et al.*, 2019).

2.8 Funções da microbiota intestinal

Considerando a relação de simbiose entre os seres humanos e sua microbiota intestinal, já são listadas diversas funções exercidas por essa microbiota para auxiliar e manter funções de homeostase no organismo humano. Uma dessas funções é a nutricional na qual as bactérias intestinais contribuem para absorção de minerais como fósforo, cálcio, ferro e também atuam na produção de vitaminas importantes para o metabolismo humano como vitamina K e vitaminas do complexo B (LEBLANC *et al.*, 2013).

Outro processo importante realizado por bactérias intestinais é a fermentação a partir de carboidratos, proteínas e carboidratos não digeríveis como as fibras que resultam em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como acetato, propionato e butirato. Os AGCC são utilizados como fontes de energia para os colonócitos, como moléculas de sinalização que se ligam a receptores envolvidos na produção de hormônios como glucagon importante no controle do apetite, e como moléculas reguladoras no sistema imune (LOUIS; HOLD; FLINT, 2014; MORRISON; PRESTON, 2016).

A microbiota intestinal tem função protetora para o seu hospedeiro atuando na manutenção da barreira intestinal auxiliando na composição e produção do muco que recobre o epitélio através da produção de AGCC (ROLHION; CHASSAING, 2016).

Outra função recém-descoberta é o eixo cérebro-intestino que vem sendo cada vez mais discutido em relação a uma possível modulação do sistema nervoso central pela microbiota. Essa comunicação ocorre pela interação de metabólitos produzidos pela microbiota com as células enteroendócrinas e através do nervo vago. Além disso a microbiota também pode contribuir para produção de moléculas neuroativas como norepinefrina e dopamina importantes na saúde do hospedeiro (MARTIN *et al.*, 2018).

Neste presente estudo investiga-se os gêneros considerados relevantes para o equilíbrio da microbiota intestinal classificados no filo *Firmicutes* (*Clostridium* e *Lactobacillus*), filo *Bacteroidetes* (*Bacteroides*), filo *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*).

2.9 Disbiose Intestinal

O desequilíbrio de comunidades da microbiota intestinal é definido como disbiose. Em sua ocorrência pode haver perturbação de funções exercidas pela microbiota para a manutenção da saúde e isso pode levar a um processo de desenvolvimento ou agravamento de doenças em seu hospedeiro. De acordo com Kriss *et al.*, (2018) a disbiose se apresenta como uma redução

da diversidade bacteriana onde ocorre a troca de comunidades anaeróbias típicas de uma microbiota saudável por comunidades de menor diversidade contendo anaeróbios facultativos aumentados.

Entre os principais fatores causais para tal condição estão o uso de medicamentos como antibióticos, ingestão excessiva de alimentos industrializados, baixa ingestão de fibras, fatores relacionados ao stress, imunidade do hospedeiro, integridade da barreira intestinal (DAVID *et al.*, 2014; SCHNORR *et al.*, 2014; THAISS *et al.*, 2014).

A disbiose intestinal tem sido amplamente relacionada a doenças metabólicas, imunológicas, doenças inflamatórias e autoimunes e condições neurológicas. Os distúrbios de origem intestinal como a Síndrome do intestino irritável (SII) tem sido associada com a disbiose onde ocorre aumento na proporção de *Firmicutes* para *Bacteroidetes* (BHATTARAI; MUNIZ PEDROGO; KASHYAP, 2017). Doenças inflamatórias intestinais (IBD) que reúnem condições crônicas como colite ulcerativa e doença de Crohn tem sido associadas a menor diversidade bacteriana (BHATTARAI; MUNIZ PEDROGO; KASHYAP, 2017; MACHIELS *et al.*, 2014). De acordo com Marasco e colaboradores (2016) portadores de doença celíaca tem uma redução em espécies consideradas benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e aumento daquelas que possuem potencial patogênico (*Bacteroides* e *E.coli*).

A relação da composição da microbiota com o desenvolvimento de doenças metabólicas tem sido alvo de muita pesquisa nas últimas décadas. Alterações na microbiota vem sendo associadas ao desenvolvimento de obesidade onde são visualizadas modificações nos principais filos com a redução de *Bacteroidetes* e aumento de *Firmicutes*. Um experimento clássico observou aumento de massa gorda total em ratos germ-free que foram colonizados com bactérias da microbiota de ratos obesos (TURNBAUGH *et al.*, 2006), e em um segundo momento o autor também mostra que o desenvolvimento de obesidade está relacionado a uma diversidade microbiana diminuída (TURNBAUGH; GORDON, 2009).

Foi observado que adultos obesos possuíam abundância relativa menor de *Bacteroidetes* e maior de *Firmicutes* e quando eram submetidos a uma dieta com restrição de carboidratos e lipídeos a abundância relativa de *Bacteroidetes* aumentava, porém esse aumento se correlacionava com a perda de peso e não com a dieta (LEY *et al.*, 2006). Diversos mecanismos tem sido descritos para explicar a influência da microbiota no desenvolvimento da obesidade dentre eles a produção excessiva de AGCC que se leva ao acúmulo de gordura no corpo a longo prazo (PAYNE *et al.*, 2012). Outro fator é a inibição do fator *Fiaf/ANGPTL4* pela microbiota intestinal, que leva a um aumento da atividade enzimática da lipoproteína Lipase (LPL) causando acúmulo de gordura nos tecidos periféricos (KHAN *et al.*, 2016). Acredita-se que a

microbiota também pode inibir a via AMPk enzima que monitora o estado de energia celular, podendo levar ao aumento de adiposidade (KHAN *et al.*, 2016).

Em outro grande estudo conduzido por Quin e colaboradores (2012) a disbiose foi constatada em pacientes portadores de diabetes tipo II, onde houve diminuição de gêneros produtores de butirato e aumento de vários patógenos oportunistas. A resposta inflamatória do hospedeiro desencadeada pelo contato com os lipopolissacarídeos (LPS) encontrados na superfície de células bacterianas da microbiota, pode acarretar uma inflamação que induz maior resistência à insulina, colaborando para o desenvolvimento do diabetes tipo II (CARVALHO; ABDALLA SAAD, 2013).

Outras condições afetadas pela disbiose intestinal é a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e hipertensão arterial responsiva ao consumo de sal tem sido associadas a mudanças na diversidade microbiana (MOUZAKI *et al.*, 2013; WILCK *et al.*, 2017). As investigações de LI *et al.*, (2017) demonstrou que o risco de hipertensão e doenças coronárias estão associados ao aumento dos gêneros *Prevotella* e *Klebsiella*, cujo mecanismo proposto envolve a produção do metabólito *trimetilamina N-óxido* por essa microbiota. Estudos recentes envolvendo condições degenerativas como Alzheimer, doença de Parkinson, transtorno do espectro do autismo, abrem caminho mostrando associações com grupos de bactérias específicos que influenciam essas condições (LI *et al.*, 2017; VOGT *et al.*, 2017).

A microbiota pode ser modulada diretamente através da dieta consumida por seu hospedeiro, uma alimentação consciente pode ser uma poderosa aliada para restabelecimento da chamada microbiota saudável que possui uma diversidade e riqueza de espécies adequadas que contribuem para o bom funcionamento de todo o organismo. Para correção de disbiose podem ser empregadas modificações alimentares onde é preconizado maior consumo de alimentos ricos em fibras, e diminuição do consumo de alimentos ricos em carboidratos e lipídeos (MILLS *et al.*, 2019).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório utilizando ratos *Wistar* que receberam uma dieta rica em carboidratos simples e treinamento aeróbico, apresentaram em sua microbiota enriquecimento do filo *Proteobacterias* associado ao desenvolvimento de obesidade. Foi também demonstrado que apenas o treino não foi eficaz para manter táxons com efeitos probióticos, mostrando assim que para uma modulação benéfica da microbiota é também necessária uma dieta equilibrada (NEVES, 2019).

2.10 Probióticos e Prébióticos

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas, em contrapartida os prébióticos são classificados como o substrato utilizado de maneira seletiva por microrganismos que confere efeitos benéficos a saúde (HILL *et al.*, 2014). Os probióticos humanos consistem em organismos pertencentes aos seguintes gêneros: *Bifidobacterium* (*adolescentes*, *animalis*, *bifidum*, *brevee longum*), *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentu*, *gasseri*, *johnsonni*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus*, *salivarius*), algumas cepas do gênero *Bacillus*. Os benefícios conferidos pelo consumo desses grupos são bem documentado pela literatura (MARKOWIAK; ŚLIZEWSKA, 2017).

Os probióticos garantem o equilíbrio adequado na microbiota intestinal, ajudam em sua restauração em caso de perturbações, auxiliam na proteção contra espécies patogênicas, colaboram no processo digestivo, tratamento de alergias e na produção de vitaminas são alguns benefícios conferidos pelos probióticos (AOUDIA *et al.*, 2016; CHILDS *et al.*, 2014; RIVIÈRE *et al.*, 2016). Os prebióticos estimulam o crescimento de diferentes espécies bacterianas no intestino, podem estar sob a forma de frutas, vegetais, cereais ou produzidos artificialmente. É necessário que cheguem ao cólon para que sejam fermentados de maneira seletiva por bactérias consideradas benéficas estimulando seu crescimento e conferindo benefícios para seu hospedeiro (MARKOWIAK; ŚLIZEWSKA, 2017).

A contribuição terapêutica de probióticos e prébióticos para saúde humana vem sendo relatada em condições como diabetes tipo 2, infecções bacterianas, distúrbios gastrointestinais, obesidade, diarreias, tratamento de disbiose intestinal. Sua utilização pode estimular o desenvolvimento e a manutenção de uma microbiota intestinal e conferir um estado de saúde para os seres humanos (ASHA; KHALIL, 2020; DU *et al.*, 2020; JANSSEN *et al.*, 2014; RITCHIE; ROMANUK, 2012).

2.11 Microbiota intestinal e suas ações no climatério

Os hormônios sexuais femininos passam por muitas alterações em seus níveis ao longo da vida o que pode modular a microbiota intestinal. Ainda são poucos os estudos que investigam a microbiota intestinal da mulher no climatério, a maioria dos estudos tem enfoque na microbiota vaginal que já é amplamente conhecida durante essa fase da vida da mulher (BROTMAN *et al.*, 2014).

Foi demonstrado que o microbioma intestinal é influenciado por níveis estrogênicos ao passo que ele também impacta de maneira significativa nos níveis desse hormônio. Os estrogênios são hormônios derivados do colesterol que atuam nos tecidos reprodutivos da mulher e possuem efeitos benéficos cardiovasculares, ósseos, cardiovasculares, neurológicos. São encontrados sob três principais formas o estradiol (E₂), a estrona (E₁), e o estriol (E₃) os quais estão presentes na circulação em sua forma livre ou conjugada a proteínas (FLORES *et al.*, 2012).

Um estudo importante realizado por Plottel e Blaser (2011) descreve o estroboloma que é um conjunto de bactérias que possuem a capacidade de metabolizar estrogênios. Esse grupo de bactérias possuem enzimas β -glucuronidases e β -glucuronídeos que podem conjugar e desconjugar estrogênios, modulando seus níveis na circulação. Os estrogênios são provenientes dos ovários, glândulas supra-renais e tecido adiposo e circulam em sua forma livre ou ligado a proteínas. No fígado ocorre sua metabolização conjugando os estrogênios e seus metabólitos que podem ser excretados na urina ou na bile através das fezes. Esses estrogênios conjugados presentes na bile podem ser desconjugados por espécies constituintes do estroboloma e podem ser reabsorvidos através da circulação até os tecidos alvos. O estroboloma então modula a circulação dos estrogênios, sua excreção e sua reabsorção (KWA *et al.*, 2016).

Foram descritos genes de β -glucuronidase bacteriana da microbiota intestinal, o gene *gus* é bem caracterizado e mais comumente encontrado em *Firmicutes*, enquanto o gene *BG* descrito mais recentemente por análises metagenômicas é encontrado em *Bacteroidetes* e também em *Firmicutes* (MCINTOSH *et al.*, 2012). A microbiota intestinal humana possui muitos gêneros com esse gene codificador para β -glucuronidase: *Collinsella*, *Edwardisiella*, *Alistipes*, *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Dermabacter*, *Escherichia*, *Faecalibacterim*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Roseburia* foram descritas na literatura (MARKOWITZ *et al.*, 2012).

A fisiologia do climatério traz a redução do estrogênio no organismo da mulher, quando ela passa também pelo processo de disbiose intestinal com redução da diversidade, isso também irá afetar o metabolismo dos estrogênios circulantes o que contribui para doenças influenciadas pela queda estrogênica como obesidade, doenças cardiovasculares, osteoporose e alguns tipos de câncer (BAKER; AL-NAKKASH; HERBST-KRALOVETZ, 2017).

Um dos efeitos protetores do estrogênio é sobre o sistema cardiovascular, pois ele auxilia no metabolismo de lipídeos circulantes, na função endotelial diminuindo a resistência vascular e com a chegada do climatério e menopausa esse efeito cardioprotetor é perdido, o que eleva o risco de doenças cardiovasculares (DCV) (PARDHE *et al.*, 2017). A hipertensão arterial

é fator de risco para ocorrência de DCV, um estudo que analisou a microbiota de ratos Wistar hipertensos e também a microbiota humana demonstrou que a disbiose da microbiota intestinal está associada a hipertensão arterial (YANG *et al.*, 2015), em outro estudo foi realizado o transplante fecal da microbiota de humanos hipertensos para camundongos *germ-free*, o que resultou em animais hipertensos (LI *et al.*, 2017). A composição da microbiota também influencia a produção de metabólitos que são associados ao risco de DCV como colina, N-óxido de trimetilamina (TMAO) e betaína (WANG *et al.*, 2011). Os níveis reduzidos de estrogênio e uma disbiose intestinal associados a fatores genéticos, dietéticos e ambientais, podem estabelecer uma conexão que impacta no desenvolvimento de DCV (YANG *et al.*, 2015)

Outra disfunção metabólica que acomete mulheres é a obesidade, que está presente em 65% das mulheres na pós menopausa. A gordura corporal acumulada pode favorecer e contribuir para a resistência insulínica, desenvolvimento de diabetes tipo 2 e DCV, esse conjunto de disfunções compões a síndrome metabólica (LOBO *et al.*, 2014). O ganho de peso na menopausa tem sido associado a falta do estrogênio pois o mesmo regula a deposição de lipídeos no tecido. A microbiota modulada através da dieta pode contribuir no controle do ganho de peso suprimindo taxóons associados a obesidade como por exemplo *Clostridiaceae*. Uma alimentação contendo prebióticos e probióticos contribui para o controle de populações bacterianas que melhoram os índices de gordura corporal em mulheres na menopausa. (LOBO *et al.*, 2014; MILLER *et al.*, 2017).

Dentre as doenças metabólicas que acometem mulheres a osteoporose pós menopausa é caracterizada pela perda óssea e destruição estrutural desencadeando maior risco de fraturas nessa fase da vida de mulheres, e estudos demonstraram a relação da microbiota intestinal sobre a homeostase óssea (SJÖGREN *et al.*, 2012). A microbiota contribui para manutenção óssea auxiliando na regulação imunológica do hospedeiro, camundongos ovariectomizados que receberam probióticos foram protegidos de perda óssea e aumento de linfócitos T CD4+ que são precursores de osteoclastos (BRITTON *et al.*, 2014). As bactérias intestinais contribuem para absorção de cálcio e vitamina D responsáveis pela manutenção da saúde óssea (SLEVIN *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2013). Recentemente foram encontradas diferenças entre a microbiota de mulheres na pós menopausa saudáveis e aquelas portadoras de osteoporose que possuíam maior abundância de *Bacteroides* em relação aquelas saudáveis (RETTEDAL *et al.*, 2021).

O câncer de mama é bem descrito como influenciado pelo estrogênio e pela microbiota intestinal. Um estudo caso controle mostrou que pacientes portadoras de câncer de mama possuíam uma diversidade alterada em sua microbiota comparada as pacientes saudáveis

(GOEDERT *et al.*, 2015). Taxóons de *Clostridia* e três gêneros de *Ruminococcaceae* foram associados com estrogênios urinários em mulheres na pós menopausa, ambos relacionados com o câncer de mama (FLORES *et al.*, 2012; FUHRMAN *et al.*, 2014; KWA *et al.*, 2016). Vem sendo demonstrado que o consumo de fitoestrogênios encontrados em alimentos como a soja e a sua metabolização através da microbiota reduzem a incidência de diversos tipos de câncer incluindo o de mama (DONG; QIN, 2011; RIETJENS; LOUISSE; BEEKMANN, 2017).

2.12 Uso de ferramentas ômicas no estudo da microbiota intestinal

A identificação da microbiota intestinal era realizada através de técnicas dependentes de isolamento e cultura desses microrganismos o que muitas vezes era demorado. Um outro fator importante é a limitação no número de espécies cultiváveis, foi observado que apenas 25% das espécies da microbiota eram cultiváveis devido suas características (LAGIER *et al.*, 2015).

Os avanços da era genômica permitiram a identificação de muitas espécies antes não cultiváveis e desconhecidas. As técnicas de sequenciamento de Nova Geração tornaram-se importantes ferramentas no estudo da microbiota intestinal. Para o estudo do microbioma é necessário adoção de boas práticas que envolvem o projeto experimental, a tecnologia de análise molecular a ser utilizada e as plataformas de análise de dados integrados as plataformas ômicas (KNIGHT *et al.*, 2018).

A microbiota intestinal vem sendo exposta através de estudos envolvendo a metagenômica que é empregada na identificação de bactérias a partir do gene 16S rRNA um marcador universal bacteriano, ou por *Shotgun* amplificando o genoma inteiro presente em uma amostra. A partir dessas técnicas é possível obter uma visão da estrutura e riqueza das espécies analisadas e o seu potencial metabólico (ALMEIDA *et al.*, 2019).

O gene bacteriano utilizado em técnicas moleculares e análises metagenômicas é o gene 16S rRNA que tem tamanho 1540 nucleotídeos e é altamente conservado. Ele possui 9 regiões conhecidas como hiper variáveis utilizadas para diferenciar espécies bacterianas (KIM; YU, 2014). Uma técnica molecular muito utilizada para identificação da microbiota humana a partir da análise do gene 16S rRNA é a técnica de Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) que é considerada uma abordagem útil para relatar a composição e quantificação microbiana de um ambiente como o intestino humano (KLINDWORTH *et al.*, 2013; KOOK *et al.*, 2018; PENDERS *et al.*, 2005; SANTOS, 2016).

Desde a última década houve um crescimento no uso de NGS para delinear perfis taxonômicos e funcionais de organismos presentes na microbiota humana. Plataformas como

454 Roche, Illumina, Ion Torrent, e mais recentemente PacBio e Nanopore vem se tornando mais acessíveis para serem utilizadas nas ciências forenses, pesquisa, diagnóstico clínico (VAN DIJK *et al.*, 2014).

Um grande volume de dados é gerado após o sequenciamento sendo necessário ferramentas de bioinformática para análises posteriores onde esses dados são refinados em Unidades Taxonômicas operacionais (OTUs) através de bancos de dados de referência como o Greengenes, RDP e Silva (KNIGHT *et al.*, 2018). Geralmente também são realizados o perfil funcional dessas OTUs fazendo previsões acerca de funções biológicas das comunidades bacterianas (ASSHAUER *et al.*, 2015).

Conhecer a composição e compreender o funcionamento da microbiota intestinal juntamente com a homeostase do organismo humano tem incitado a ciência no presente momento. Um desafio da medicina personalizada é avaliar a microbiota intestinal de cada indivíduo e sua resposta ao meio, utilizando-a como possível marcador de doenças ou para instruir o tratamento de acordo com as particularidades de cada pessoa. Buscar uma microbiota intestinal indicadora de saúde ou de doença se mostra como uma perspectiva presente na pesquisa e diagnóstico clínico

Os avanços metodológicos têm possibilitado uma melhor compreensão sobre a composição da microbiota intestinal e suas funções, porém deve ser compreendido que o custo e o acesso a alguns desses métodos pode ser dispendioso financeiramente, dependem de uma estrutura física e mão de obra qualificada, e em decorrência desses fatores pode gerar uma demora em diagnosticar condições patológicas. O uso de ensaios moleculares sob a forma de kits permite um maior acesso para os estudos independentes que não possuem estrutura dos grandes laboratórios, tornando a pesquisa e diagnóstico acessível, com maior agilidade e menor custo financeiro (BIKEL *et al.*, 2015; ORTIGÃO *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde demonstrou em seu relatório que a média global de expectativa de vida para a mulheres é de 76 anos de idade (OMS 2019). Durante a vida da mulher ocorre o climatério um evento fisiológico que envolve a transição do período reprodutivo para o não reprodutivo, onde acontece a menopausa caracterizada pelo último ciclo menstrual seguido de doze meses de amenorréia. Esse período ocorre entre 40 a 65 anos de idade o que indica que a mulher vive um terço de toda sua vida sob condições ocorridas após o climatério (SOBRAC, 2013).

O climatério acarreta mudanças físicas, psicológicas e hormonais, que influenciam fortemente a qualidade de vida nesse período. O declínio estrogênico estabelece relação com diversos sistemas no organismo da mulher dentre eles a microbiota intestinal, o que pode contribuir ou acarretar para disbiose de comunidades bacterianas intestinais, trazendo prejuízos a saúde da mulher em contribuição a condições como obesidade, síndrome metabólica, diabetes, osteoporose (PLOTTEL; BLASER, 2011).

Conhecer os componentes de uma microbiota benéfica e seus mecanismos têm sido proposto por estudos de metagenômicos, que identificam espécies e suas funções metabólicas. Ainda são escassos os estudos sobre microbiota intestinal da mulher no climatério, se faz necessário identificar e correlacionar grupos bacterianos presentes nessa fase e aqueles que sofrem alterações decorrente de mudanças hormonais (ALMEIDA *et al.*, 2019; BAKER; AL-NAKKASH; HERBST-KRALOVETZ, 2017).

Perante as descobertas acerca do impacto que a microbiota intestinal exerce sobre a saúde, se faz necessário conhecer o perfil dessa microbiota e a sua correlação com eventos como o climatério. Há uma necessidade de investimento em diagnóstico individual, assertivo e de custo acessível para a microbiota, tornando-a um parâmetro de diagnóstico de rotina que auxilia na prevenção e correção de desordens que possam causar o adoecimento da mulher climatérica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar a microbiota intestinal de uma coorte de mulheres em fase de climatério na cidade de Ouro Preto – MG e correlacionar com a presença de alterações nos padrões bioquímicos e hormonais dessa coorte.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a população do estudo por meio de questionário sociodemográfico, seu estágio de envelhecimento reprodutivo, e sintomas climatéricos através da escala MRS.

- Quantificar os gêneros bacterianos *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium* na microbiota intestinal utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR).

- Correlacionar os gêneros quantificados com os parâmetros bioquímicos e hormonais.

- Caracterizar a microbiota intestinal utilizando Sequenciamento de Nova Geração.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

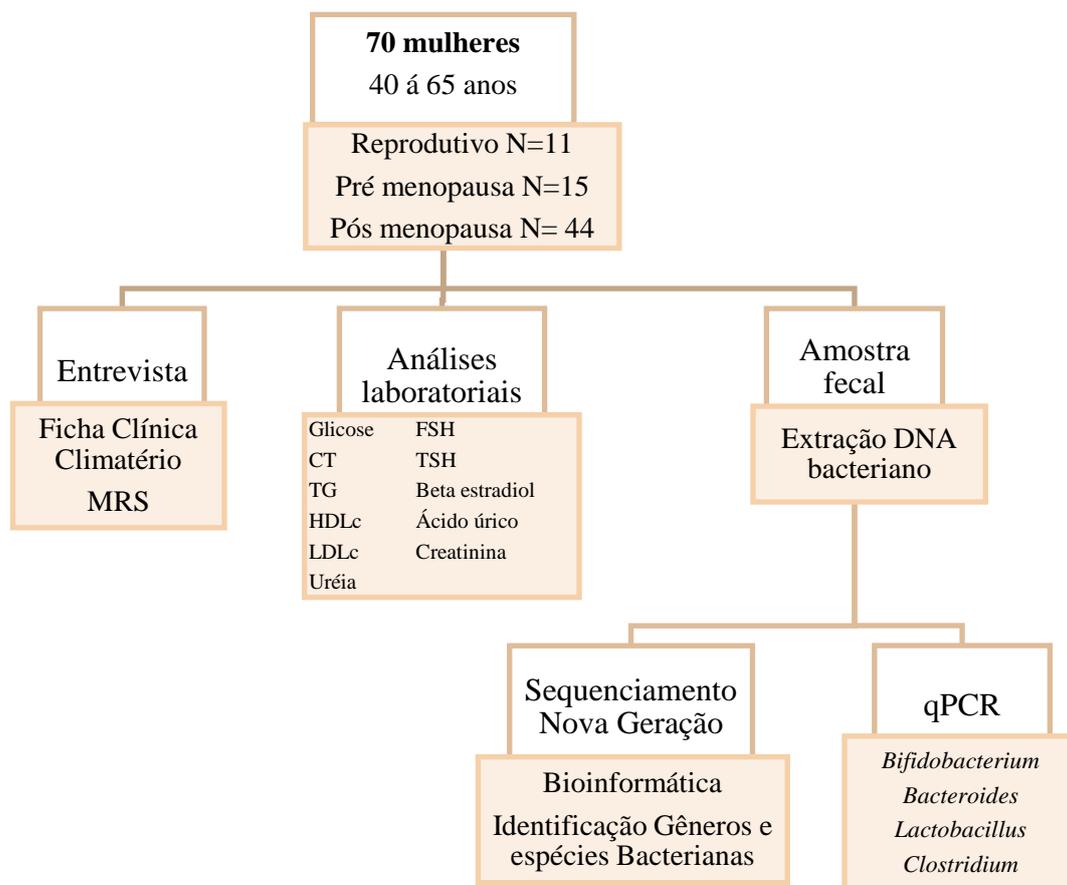
5.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi realizado na cidade de Ouro Preto – Estado de Minas Gerais, no Laboratório de Bioquímica e Biologia molecular (LBBM), localizado na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). A pesquisa foi submetida ao Comitê de ética e pesquisa envolvendo seres humanos (CEP/UFOP) e aprovada sob o protocolo CAAE 29723420.9.0000.5150 (ANEXO A). As mulheres convidadas para o estudo foram instruídas acerca da existência desse protocolo e concordaram assinando o termo de consentimento Livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO B) para serem inseridas no estudo.

5.2 Delineamento do estudo

Para realização deste trabalho foram convidadas 70 mulheres residentes na cidade de Ouro Preto – Minas Gerais – e dos seus distritos. O contato com as participantes foi possível devido ao trabalho em conjunto com a equipe do Programa Âmbor, que desde 2013 desenvolve ações voltadas para as equipes de saúde e para mulheres usuárias do sistema Único de Saúde na cidade. O programa Âmbor compartilhou o banco de dados pré-existente de mulheres em fase de climatério, assim foi realizado o recrutamento, onde foram selecionadas mulheres com idade de 40 a 65 anos que utilizavam o SUS e a rede privada de atendimento hospitalar na cidade. Foram incluídas mulheres com relatos de sintomas vasomotores, geniturinários, com alteração no ciclo menstrual relacionado a fase do climatério e aquelas que já possuíam amenorreia por um ano ou mais. As participantes foram entrevistadas e passaram por uma coleta de sangue para análises laboratoriais. Também foi realizada a coleta de fezes pelas participantes no seu local de residência sob prévia orientação.

Figura 2: Fluxograma para realização do estudo.



MRS= Escala de avaliação da menopausa; CT= colesterol total; HDLc= lipoproteína de alta densidade; LDLc= lipoproteína de baixa densidade; TG = triglicerídeos; TSH= hormônio tireoestimulante; FSH= hormônio foliculo estimulante; NGS = Sequenciamento de Nova Geração; qPCR= Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real.

5.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas mulheres histerectomizadas, casos de neoplasia maligna de mama e endométrio, sangramento genital anormal de causa desconhecida após a menopausa; história de tromboembolismo atual ou prévio (trombose venosa profunda, doença tromboembólica); diagnóstico de vaginose no momento do recrutamento. As coletas de dados e amostras biológicas tiveram início em agosto de 2020 e foram realizadas até fevereiro de 2021.

5.4 Entrevista

A entrevista foi agendada por contato telefônico com as participantes e na data marcada cada mulher foi entrevistada individualmente em espaço reservado. A ficha clínica do climatério (ANEXO C) foi o instrumento utilizado para obtenção dos dados sociodemográficos,

comportamentais, e aspectos reprodutivos. Para avaliar o grau dos sintomas referentes a menopausa, foi utilizado o “Menopause rating scale (MRS)” (ANEXO D) (HAUSER *et al.*, 1994). Ao término da entrevista foi realizada a coleta de sangue e realizada as recomendações para coleta de fezes.

5.5 Análise do perfil bioquímico e hormonal

Foi realizada coleta de sangue das participantes que foram previamente orientadas a evitar o consumo de bebidas alcoólicas por 72 horas antes da coleta e manter o jejum alimentar de doze horas antes para a realização do exame. A coleta foi feita através de punção venosa periférica em membros superiores, utilizando tubo de 5 mL contendo gel separador. O material logo em seguida foi encaminhado para centrifugação, e obtido o soro para dosar os seguintes parâmetros bioquímicos: Perfil lipídico (CT, TG, HDLc, LDLc), glicose, ureia, cálcio, creatinina, ácido úrico. Essas análises bioquímicas foram realizadas no analisador automatizado COBAS INTEGRA® 400 plus (Roche).

As dosagens hormonais realizadas foram: 17 -Beta Estradiol, Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), Hormônio tireoestimulante (TSH), para isso foi utilizado o equipamento ACCESS 2 IMMUNOASSAY SYSTEM® (Beckman Coulter). Todas as análises foram feitas no laboratório piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

5.6 Coleta de Fezes

As participantes receberam um kit para coleta de fezes identificado contendo: 01 pote transportador 50ml, 01 espátula, 01 revestimento estéril para vaso sanitário, tornando a coleta mais confortável e minimizando riscos de contaminação da amostra. Elas foram orientadas conforme o procedimento de uso do kit coletor e realizaram a coleta em sua residência, mantendo a amostra em refrigeração até o momento da entrega no posto de saúde de referência do seu bairro. As amostras foram recolhidas e transportadas sob refrigeração até o laboratório de Biologia molecular na UFOP, aonde foram aliquotadas em 15mg e armazenadas em freezer -80°C até o período da realização da extração do DNA.

5.7 Extração de DNA

As extrações de DNA fecal foram realizadas nas 70 amostras obtidas. Como método adaptado e padronizado para extração de DNA das fezes foi utilizado o protocolo do *International Human Microbiome Standard* (IHMS/<http://www.microbiome-standards.org/>) sendo escolhido para uso o protocolo H (FOR; SAMPLES; EXTRACTION, 2015).

O processo de extração utilizou 15mg de fezes previamente pesadas em um *ependorf* estéril de 2 mL e seguiam armazenadas em freezer - 80°C. A essas amostras congeladas foi adicionado 250 µL de solução de isotiocianato de guanidina (4M) seguido por adição 40 µL de solução N-laurilSarcosina 10% e após o descongelamento da amostra adicionado 500 µL de solução N-laurilSarcosina 5% que atua na remoção de lipídeos presentes nas amostras. Amostras incubadas a 70°C por 01 hora em termobloco. Adicionado 750 mg de *beads* de vidro com diâmetro de 0,1cm e homogeneizado com auxílio do vórtex.

Dando seguimento ao protocolo foi adicionado 10 mg de Polivinilpolipirrolidona (PVPP), amostras agitadas vigorosamente e centrifugadas a 9.000 g por 5 minutos a 4°C. Adicionado 500 µL TENP (tampão Tris-HCL, EDTA, NaCl e PVPP) realizada centrifugação a 9.000 g por 10 minutos mantendo a temperatura de 4°C e coletado o sobrenadante em outro *ependorf*. Esse procedimento de lavagem utilizando o TENP e centrifugação foi repetido três vezes, sendo que a cada centrifugação o sobrenadante foi transferido para o outro *ependorf*. Essas lavagens auxiliam na remoção de metabólitos secundários que possam estar presentes na amostra.

O DNA foi precipitado com 1 mL de Isopropanol, homogeneizado por inversão e centrifugado a 9.000 g por 10 minutos. Descartado o sobrenadante e adicionado 450 µL de tampão Phosphate e 50 µL acetato de Potássio, dissolvendo o DNA precipitado suavemente. Amostras foram mantidas em refrigeração por 01 hora e 30 minutos, centrifugadas e recuperado sobrenadante contendo DNA, que foi tratado com 10mg/µL de Rnase (Sigma). Adicionado 50 µL de acetato de Sódio (3M) e 1 mL de etanol 100% e amostras mantidas em uma temperatura de -20°C por um período de 14 a 16 horas. Finalizando a extração as amostras foram submetidas a três lavagens sucessivas com etanol 70% sempre mantendo a centrifugação 12.000 g por 5 minutos a 4°C. Ao término do processo o DNA precipitado foi ressuspenso em 200µL de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8 conforme indicado pelo protocolo e armazenado a 4°C (BAG *et al.*, 2016; FOR; SAMPLES; EXTRACTION, 2015).

O DNA extraído foi quantificado pelo método de espectrometria através do equipamento NanoDrop™ Lite Spectrophotometer®. Para avaliar a concentração e pureza da

amostra utilizou-se a medida de absorvância através do comprimento de onda 260/280 nm sendo indicadas amostras de boa qualidade aquelas com valores de razão entre 1,8 e 2,0 (ThermoFisher Scientific). Dando continuidade na avaliação de qualidade e integridade do DNA extraído, foi realizada eletroforese do DNA genômico em gel de agarose na concentração 0,6% corado com Brometo de etídeo, onde foi possível confirmar a integridade do DNA e excluir contaminação por RNA (BAG *et al.*, 2016). As condições estabelecidas para realização da eletroforese foram o uso de tampão TBE 0,5X e corrente elétrica de 80 volts e a imagem documentada por meio de um transiluminador UV (SAMBROOK, JOSEPH & MANIATIS, 1987).

5.8 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi padronizada a partir de 30 ng de DNA, utilizando o kit da Thermofisher/Brasil e seguindo os seguintes parâmetros no termociclador: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos: 95° C por 15 segundos / 60°C 15 segundos/ 72° C por 33 segundos e 1 ciclo de 72°C por 9 minutos. Realizada nova eletroforese em gel de agarose 1,2% para verificar a amplificação do DNA onde cada gênero apresenta uma banda específica de tamanho.

Quadro 2: Sequência de Primers utilizados para amplificação dos gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho pb</i>
Universal 16S	<i>Forward</i> (TCC TAC GGG AGG CAG CAG T) <i>Reverse</i> (GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT)	467 pb
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Forward</i> (GGG TGG TAA TGC CGG ATG) <i>Reverse</i> (TAA GCG ATG GAC TTT CAC ACC)	442 pb
<i>Bacteroides</i>	<i>Forward</i> (ATA GCC TTT CGA AAG RAA GAT) <i>Reverse</i> (CCA GTA TCA ACT GCA ATT TTA)	495 pb
<i>Lactobacillus</i>	<i>Forward</i> (AGC AGT AGG GAA TCT TCC A) <i>Reverse</i> (CAC CGC TAC ACA TGG AG)	341 pb
<i>Clostridium</i>	<i>Forward</i> (CGG TAC CTG ACT AAG AAG C) <i>Reverse</i> (AGT TTY ATT CTT GCG AAC G)	429 pb

(KOOK *et al.*, 2018)

5.9 Quantificação dos gêneros bacterianos por PCR em tempo real (qPCR)

A partir do DNA extraído foi realizada a construção de uma curva padrão utilizando o *primer* universal para o gene 16S rRNA e realizada através de qPCR. Para os ensaios foi utilizado o kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix, sistema *Sybr Green* (Applied Biosystems, Life Technologies) e placas de 96 poços seladas com selo óptico (Applied Biosystems).

A quantificação se deu inicialmente a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, na qual a reação de qPCR teve um volume final de 10 µL: sendo 4,9 µL referente ao master mix, 0,1 µL de CXR (corante de referência), 3 µL *primers* (solução de uso contendo *Forward* e *Reverse* na concentração 10 miliMolar), 1 µL água miliQ estéril, e 1 µL do DNA na concentração inicial de 10 ng. Foram utilizados também outras concentrações de DNA para construção da curva padrão (1ng/ 0,1 ng/ 0,01ng/ 0,001ng/ 0,0001 ng). As reações foram preparadas em triplicata e o aparelho utilizado foi *7300 Real-Time PCR* (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos referente a desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguidos pelo anelamento dos *primers* a 60 °C por 1 minuto. Ao término da amplificação foi aplicada a seguinte fórmula para obter o número de cópias de DNA bacteriano em cada diluição:

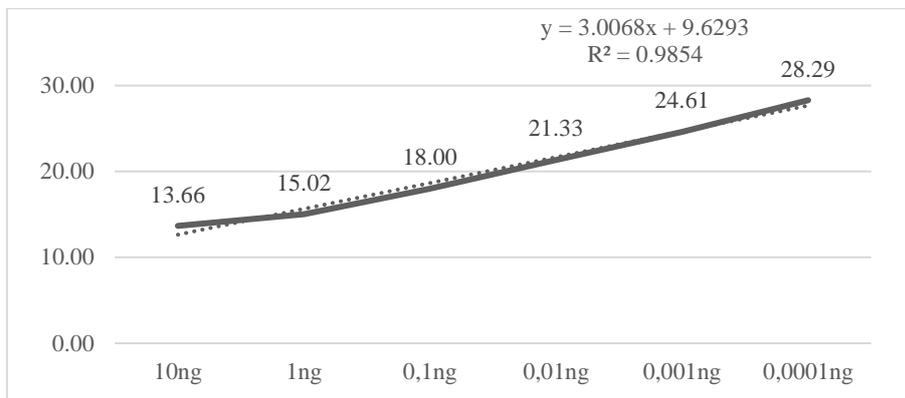
$$\text{Núm. cópias} = [\text{DNA (g/}\mu\text{L)} \times 6'022 \times 10^{23} \text{ (pb/mol)}] / [\text{lenght (pb)} \times 660 \text{ (g/mol)}]$$

Onde a fórmula representa:

- DNA(g/µL):Concentração de DNA utilizado (10ng/ 1ng/ 0,1ng/ 0,01ng/ 0,001ng/ 0,0001ng/)
- Constante: $6'022 \times 10^{23}$
- Lenght: 4,600.00pb (DNA *E.coli*)
- Constante: 660 (g/mol)

Obtendo o número de cópias de DNA e sua quantidade em nanogramas correspondente ao *Ciclo Treshold* (Ct) apontado na amplificação. Cálculos apresentados no ANEXO E.

Figura 3: Curva padrão gerada a partir dos pontos de Ciclo Treshold obtidos com a amplificação de diferentes concentrações de DNAg.



Após a obtenção da curva padrão foi dada continuidade a quantificação dos quatro gêneros bacterianos em todas as amostras analisadas. O protocolo foi mantido e reproduzido respeitando as mesmas condições dos reagentes, utilizando 10ng de DNA para todas as reações e apenas o *primer* era alterado conforme o gênero avaliado. Utilizadas as mesmas condições de temperatura no 7300 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems) o qual utiliza a intensidade do DNA amplificado com a referência ROX. Ao final da reação é utilizado o valor do Ciclo Treshold (CT) que é o número de ciclos necessários para que o aparelho detecte a amplificação do alvo através da fluorescência emitida (BUSTIN *et al.*, 2009). Mantido o uso da fórmula para cálculo do número de cópias de DNA referente ao ciclo de amplificação, todos os cálculos estão detalhados no ANEXO F para todas as 70 amostras.

5.10 Sequenciamento de Nova Geração

Nove amostras foram encaminhadas para sequenciamento. Foram contratados os serviços da empresa Proteimax Biotecnologia LTDA, São Paulo – Brasil, onde foi realizado o processo de construção da biblioteca do RNAr 16s V3/V4 e o sequenciamento. Em um primeiro momento foi realizada a construção da biblioteca genômica utilizando os seguintes *primers* para a região V3 e V4 do RNAr 16S: 341 *Forward* (CCT ACG GGN GGC WGC AG) e 805 *Reverse* (GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC) (FUJIYOSHI; MUTO-FUJITA; MARUYAMA, 2020; KLINDWORTH *et al.*, 2013). A biblioteca foi preparada utilizando o kit Nextera® XT (ILLUMINA, 2013, 2016). Após a construção da biblioteca foi iniciado o sequenciamento utilizando o sequenciador *Illumina*® NovaSeq6000 com o kit SP Reagent kit v1.5 (500 ciclos) (2x250bp).

5.11 Análise dos dados sequenciados

Após o sequenciamento foram gerados resultados no formato de texto FASTQ, que contém as sequências de nucleotídeos e os seus índices de qualidade correspondentes. As análises dos resultados do processamento metagenômico destes dados possibilitam a observação da composição predominante da microbiota fecal das participantes do estudo. Além disso, é possível analisar os conjuntos de metabólitos produzidos por estes organismos identificados na microbiota fecal.

5.12 Controle de qualidade

Um estudo da qualidade das amostras sequenciadas utilizando os arquivos FASTQ foi conduzido utilizando a ferramenta PRINSEQ-lite 0.20.4 (<http://prinseq.sourceforge.net/>) (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). O controle de qualidade das amostras foi realizado através de um filtro de sequências, baseado no índice Phred (EWING *et al.*, 1998). Neste trabalho, utilizamos um valor de Phred20 como parâmetro no processo de filtragem.

5.13 Análise das sequências obtidas e classificação taxonômica

Para estudar a composição da microbiota das amostras, realizamos análises metagenômicas utilizando o *software* QIIME 2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (BOLYEN *et al.*, 2019). A partir dos arquivos FASTQ, com as sequências resultantes do processo de controle de qualidade, são gerados arquivos de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). Neles, as sequências de 16S rRNA de cada amostra estão agrupadas por um critério de semelhança.

Um classificador Naive Bayes treinado na base de dados Silva, que possui qualidade controlada de genes rRNA (QUAST *et al.*, 2012), infere a taxonomia de cada OTU, em cada um dos diferentes níveis taxonômicos (domínio, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie) (SCHLOSS; WESTCOTT, 2011). A partir destes dados são realizadas as análises metagenômicas.

5.14 Classificação metabólica funcional *in silico*

As OTUs obtidas como descrito no item 5.13 foram processadas pela ferramenta PICRUST 1.1.4 (LANGILLE *et al.*, 2013), produzindo as predições funcionais metagenômicas

de cada amostra. Os arquivos de metadados foram processados juntamente com os arquivos de predições metabolômicas no programa STAMP (PARKS *et al.*, 2014) para gerar análises exploratórias dos perfis funcionais através de testes de hipóteses estatísticos. Para a classificação funcional das sequências identificadas foi utilizado a *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), como descrito em <https://www.genome.jp/kegg/docs/relnote.html>.

5.15 Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir da ficha clínica, MRS e resultados laboratoriais foram codificados e digitados sob dupla checagem utilizando o *software* EpiData (versão 3.2). As análises estatísticas foram realizadas através do *software* *GraphPad Prism*, versão 8.01 for Windows, (San Diego, CA, USA). A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. Variáveis com distribuição normal foram expressas por suas médias e desvio padrão, já os dados que não apresentaram normalidade em sua distribuição foram expressos através da mediana. Para comparação de médias e desvio padrão usado teste One way ANOVA seguido de pós teste de Tuckey, e para valores expressos pela mediana os dados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da amostra

Participaram do estudo 70 mulheres residentes na cidade de Ouro Preto (MG), que foram classificadas de acordo com o Estágio de envelhecimento reprodutivo e *status* menopausal (STRAW EER) (HARLOW *et al.*, 2012). Os dados foram obtidos por meio de questionário apresentado no ANEXO C. A Tabela 1 mostra a classificação STRAW das participantes e a maior parte das mulheres se encontravam no estágio de Pós menopausa (63% n=44).

Tabela 1: Classificação das mulheres de acordo com os estágios de envelhecimento reprodutivo e *status* menopausal.

Estágios	Frequência	
	n	%
Fase reprodutiva	11	16
Pré menopausa	15	21
Pós menopausa	44	63
Status menopausal		
Pré menopausa	26	37
Pós menopausa	44	63
Total	70	100

Fonte: Elaborado pelo autor

O perfil sociodemográfico e comportamental é apresentado mantendo a estratificação dos grupos conforme o estágio reprodutivo (Tabela 2). A idade média no período reprodutivo foi de 44 anos, pré menopausa 49,2 anos e pós menopausa 54,6 anos. Em todos os três grupos a maioria das mulheres possuía companheiro, e em relação ao sistema de saúde prevaleceu o uso do sistema público (Reprodutivo: 55%, pré menopausa: 87% e pós menopausa 82%).

Ao avaliar as características comportamentais o grupo reprodutivo não apresentou nenhuma participante tabagista, apenas duas mulheres em pré menopausa eram fumantes e em pós menopausa quatro mulheres. Ao verificar o etilismo havia uma pequena parcela de mulheres em cada grupo que alegou o consumo frequente de bebidas alcoólicas (reprodutivo: 18%, pré menopausa: 20% e pós menopausa: 7%). Foi possível constatar entre os grupos

avaliados que mais da metade das mulheres alegaram não realizar atividade física de modo regular.

Tabela 2: Caracterização sociodemográfica e comportamental das participantes.

Variáveis	Reprodutivo (n=11)	Pré menopausa (n=15)	Pós menopausa (n=44)
Idade (Média)	44,0	49,2	54,6
Status Marital			
Sem companheiro	3 (27%)	5 (33%)	17 (39%)
Com companheiro	8 (73%)	10 (67%)	27 (61%)
Sistema de Saúde			
Público	6 (55%)	13 (87%)	36 (82%)
Privado	1 (9%)	0	1 (2%)
Ambos	4 (36%)	2 (13%)	7 (16%)
Número de Filhos			
Nenhum	0	3 (20%)	4 (9%)
1	3 (27%)	3 (20%)	10 (23%)
2	5 (46%)	4 (27%)	15 (34%)
3 ou mais	3 (27%)	5 (33%)	15 (34%)
Tabagismo			
Sim	0	2 (13%)	4 (9%)
Não	11 (100%)	13 (87%)	40 (91%)
Etilismo			
Sim	2 (18%)	3 (20%)	3 (7%)
Não	9 (82%)	12 (80%)	41(93%)
Atividade Física			
Regular			
Sim	3 (27%)	2 (13%)	10(23%)
Não	8 (73%)	13(87%)	34 (77%)

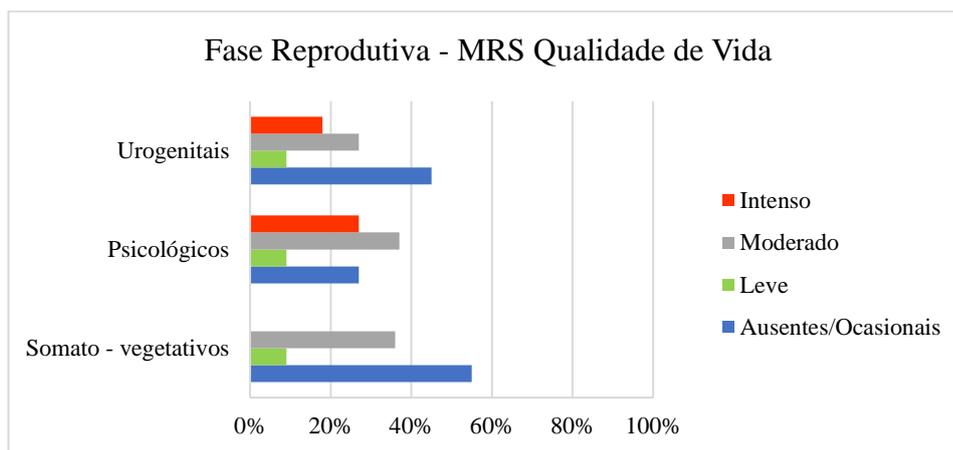
Fonte: Elaborado pelo autor

6.2 Escala de avaliação de menopausa (MRS)

Os sintomas do climatério e qualidade de vida foram avaliados utilizando o *Menopause Rating Scale (MRS)* (HAUSER *et al.*, 1994) que avalia os sintomas somato- vegetativos, sintomas psicológicos e urogenitais. No grupo reprodutivo 55% das mulheres descreveram

sintomas somato-vegetativos ausentes ou de forma ocasional, sintomas psicológicos ocorreram em 37% com intensidade moderada e sintomas urogenitais permaneceram ausentes ou ocorrendo ocasionalmente em 45% desse grupo, conforme pode ser observado na Figura 4.

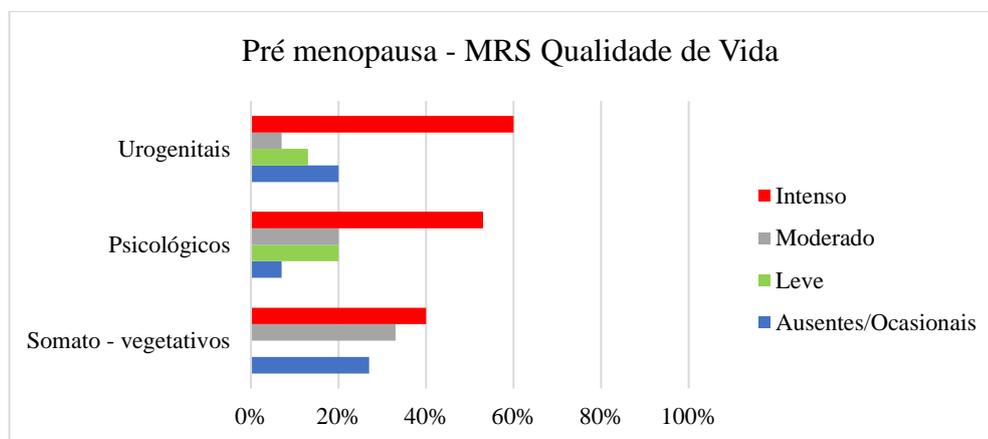
Figura 4: Frequência (%) de mulheres em fase reprodutiva que apresentaram sintomas na escala MRS.



Fonte: Elaboração própria

Podemos observar na Figura 5 que mulheres em pré menopausa relataram sintomas urogenitais intensos (60%), sintomas psicológicos intensos (53%) e somato-vegetativos (40%) intensos. De acordo com o MRS apresentar esses sintomas de maneira intensa pode indicar uma pior qualidade de vida.

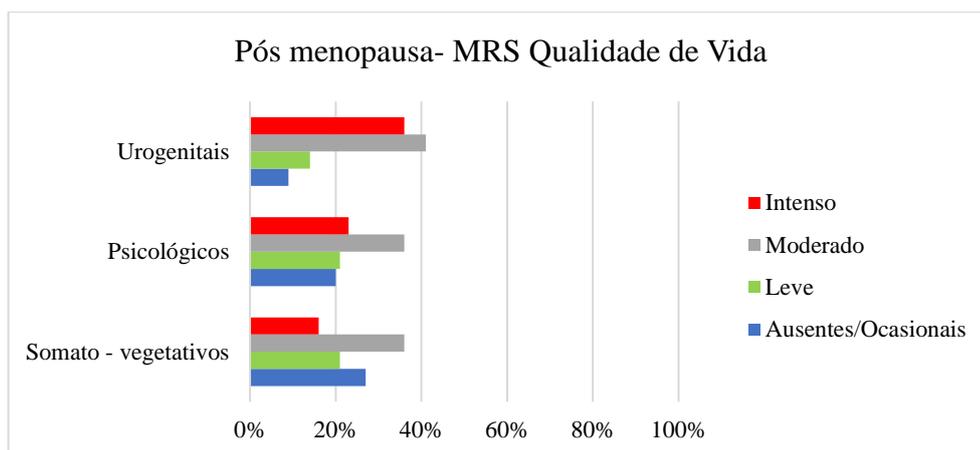
Figura 5: Frequência (%) de mulheres em pré menopausa que apresentaram sintomas na escala MRS.



Fonte: Elaboração própria

Após a menopausa os sintomas urogenitais permanecem em maior ocorrência (41%) porém com a intensidade moderada. Sintomas psicológicos e somato-vegetativos se apresentam em proporções iguais (36%) de intensidade moderada conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6: Frequência (%) de mulheres pós menopausa que apresentaram sintomas na escala MRS



Fonte: Elaboração própria

6.3 Análises dos parâmetros bioquímicos

Os dados bioquímicos foram mensurados e comparados entre os grupos como apresentado pela Tabela 3. Ao avaliar o perfil lipídico é observado que o valor médio de Colesterol total se encontra elevado em todas as fases do climatério: reprodutivo $199,4 \pm 29,8$ mg/dL, pré menopausa $221,9 \pm 50,6$ mg/dL e pós menopausa $230,0 \pm 55,6$ mg/dL. Valores referentes a ureia, cálcio e ácido úrico apresentaram diferença significativa entre as fases reprodutivas ($p < 0,05$).

Tabela 3: Parâmetros bioquímicos obtidos para os grupos reprodutivo, pré menopausa e pós menopausa.

Analito Bioquímico	Reprodutivo Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP	Pré menopausa Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP	Pós menopausa Mediana; 1° - 3° Quartis ou Média±DP	P valor
Glicose (mg/dL)	86,0 (84 - 96)	86,0 (72 - 98)	94,0 (82 - 103)	
HDL-c (mg/dL)	62,0 (44 - 67)	50,0 (45 - 62)	52,5 (42,2 - 63,5)	

LDL-c (mg/dL)	121,0 (96 - 146)	136,0 (105 - 159)	141,5 (103,4 - 185,5)	
Triglicérides (mg/dL)	78,0 (56 - 138)	125,0 (101 - 166)	116,5 (96 - 212,8)	
VLDL (mg/dL)	16,0 (11 - 28)	25,0 (20 - 33)	23,0 (19 - 42,5)	
CT (mg/dL)	199,4 ± 29,8	221,9 ± 50,6	230,0 ± 55,6	
Creatinina (mg/dL)	0,71 (0,67 - 0,72)	0,80 (0,67 - 0,84)	0,76 (0,68 - 0,84)	
Ureia (mg/dL)	23,0 (16 - 26)	27,0 (26 - 36) ^a	30,0 (25 - 35,7) ^b	0,0218 ^a 0,0050 ^b
Cálcio (mg/dL)	9,38 ± 0,24	9,71 ± 0,41	9,81 ± 0,40 ^b	0,0038
Ácido Úrico (mg/dL)	4,23 ± 0,96	5,46 ± 1,78 ^a	5,09 ± 1,15	0,0492

Fase Reprodutiva n=11; Pré menopausa n=15; Pós menopausa n=44; CT = colesterol total; HDLc = lipoproteína de alta densidade; LDLc = lipoproteína de baixa densidade. Dados normais expressos em média ± desvio padrão (M ± DP) e dados não paramétricos são mostrados como mediana (máximo – mínimo). Para dados normais realizado One way ANOVA com pós teste de Tukey enquanto para dados não paramétricos utilizado teste de Kruskal-Wallis. Valores de p < 0,05 foram considerados significativos estatisticamente.

a: Diferença significativa entre grupo reprodutivo e pré menopausa.

b: Diferença significativa entre grupo reprodutivo e pós menopausa.

6.4 Análise dos parâmetros hormonais

Os valores hormonais foram avaliados e comparados entre os estágios de envelhecimento reprodutivo. Os hormônios Beta estradiol, FSH e LH apresentaram diferença significativa entre os grupos conforme apresentado pela Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros hormonais avaliados para os grupos reprodutivo, pré menopausa e pós menopausa.

Analito	Fase Reprodutiva Mediana; 1° - 3° Quartis	Pré menopausa Mediana; 1° - 3° Quartis	Pós menopausa Mediana; 1° - 3° Quartis	P valor
Beta-estradiol (picog/mL)	197,7 (111,7 - 226,0)	41,4 (18,6 - 137,9)	16,7 (12,6 - 21,7) ^{b,c}	< 0,0001 ^b 0,0022 ^c
FSH (mUI/mL)	3,8 (2,9 - 6,1)	26,05 (7,1 - 51,4) ^a	42,1 (30,5 - 62,6) ^b	0,0356 ^a < 0,0001 ^b

LH (mUI/mL)	4,49 (3,3 - 11,7)	18,6 (7,9 - 45,1)	38,1 (29,5 - 52,6) ^b	< 0,0001
TSH (microUI/mL)	2,1 (1,8 - 3,0)	1,6 (1,0 - 3,3)	2,5 (1,5 - 3,3)	>0,999

Dados não paramétricos mostrados com mediana (máximo – mínimo). Realizado teste de Kruskal-Wallis onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. FSH = Hormônio Folículo estimulante; LH= Hormônio Luteinizante; TSH= Hormônio Tireoestimulante.

a: Diferença significativa entre grupo reprodutivo e pré menopausa.

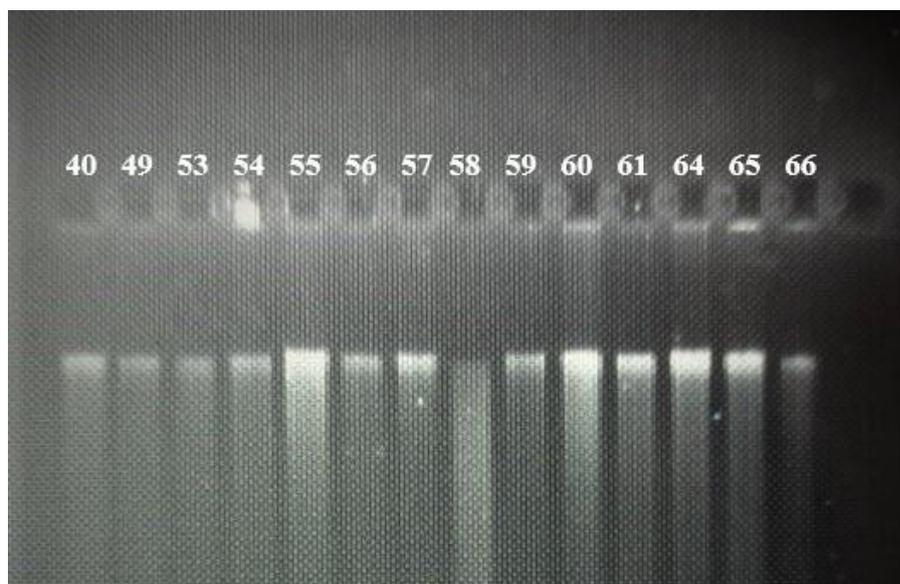
b: Diferença significativa entre grupo reprodutivo e pós menopausa.

c: Diferença significativa entre grupo pré menopausa e pós menopausa.

6.5 Integridade e qualidade do DNAg extraído de amostras fecais

O protocolo utilizado para extração do DNA das amostras de fezes das participantes do projeto se mostrou eficiente, com presença de uma única banda íntegra de DNAg identificada como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7: Análise da qualidade do DNAg extraído de amostras fecais



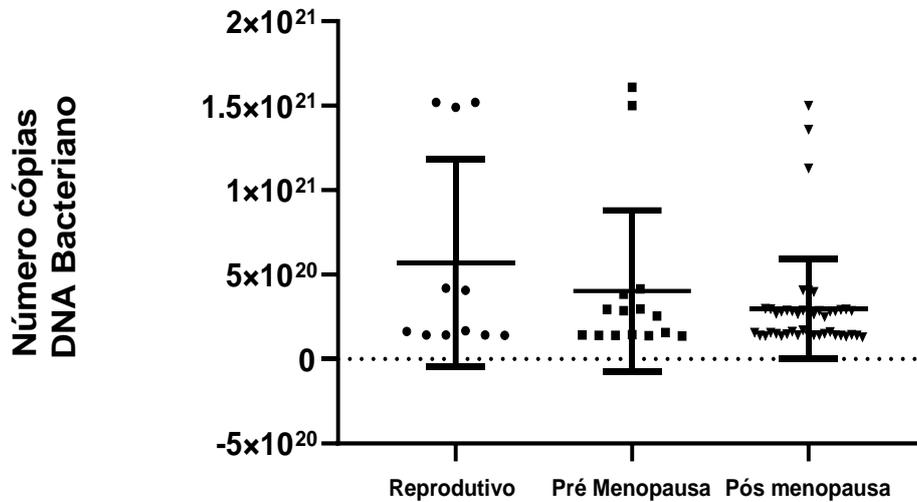
Cada banda corresponde a uma amostra. Cerca de 80ng de DNAg foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,6% em TBE 0,5x e corado com Brometo de etídeo.

6.6 Quantificação dos gêneros bacterianos através de qPCR

Realizada a quantificação de cópias totais de DNA bacteriano em todas as amostras utilizando *Primers* rRNA 16S, e mantendo a estratificação dos estágios de envelhecimento reprodutivo não foram observadas diferenças estatísticas significantes avaliando o valor total

de carga bacteriana entre os três grupos. No entanto o menor número de cópias foi encontrado no grupo de mulheres em fase reprodutiva ($1,30 \times 10^{20}$) enquanto a maior quantidade de cópias de DNA bacteriano foi verificada em mulheres na pré menopausa ($1,60 \times 10^{21}$). A figura 8 representa o número total de cópias de DNA bacteriano entre os grupos.

Figura 8: Quantificação de bactérias por qPCR a partir de amostras fecais de mulheres no climatério

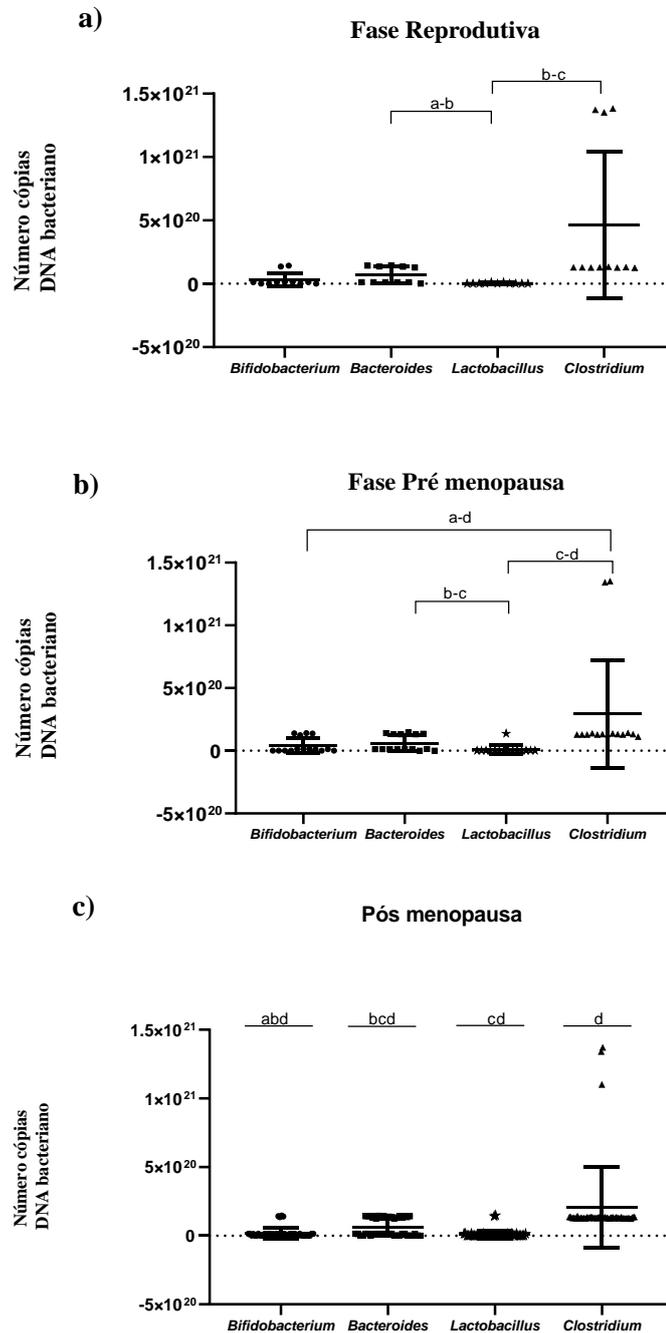


Fonte: Elaboração própria

Fase Reprodutiva n=11; Pré menopausa n=15; Pós menopausa n=44; realizado teste de Kruskal-Wallis e dados não paramétricos são mostrados com mediana (máximo – mínimo). Não foi verificada diferença significativa para o número de cópias de DNA bacteriano entre os três grupos. Obs: Número de cópias de DNA bacteriano em 15mg de fezes.

Os quatro gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium* foram quantificados e avaliados conforme o estágio envelhecimento reprodutivo. Foram observadas diferenças significativas estatisticamente entre os gêneros quando avaliado o estágio reprodutivo separadamente conforme apresentado na figura 9.

Figura 9: Quantificação por qPCR dos gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium* a partir de amostras fecais de mulheres no climatério.



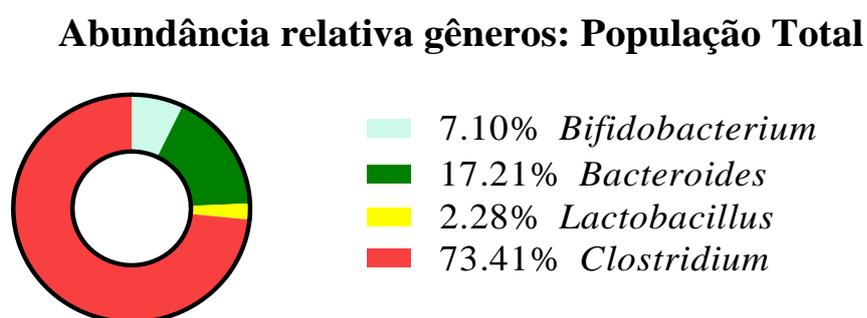
Fonte: Elaboração

própria

Dados não paramétricos realizado teste de Kruskal-Wallis para múltiplas comparações onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. O número de cópias de DNA bacteriano foi obtido para cada 15mg de fezes. **a)** Fase Reprodutiva $n=11$ diferença significativa entre a quantidade de *Bacteroides* comparada a *Lactobacillus* e *Lactobacillus* comparado a *Clostridium*. **b)** Pré menopausa $n=15$ diferença significativa observada entre quantidade de *Bifidobacterium* versus *Clostridium*, *Bacteroides* versus *Lactobacillus* e *Lactobacillus* versus *Clostridium*. **c)** Pós menopausa $n=44$ houve diferença na quantidade dos gêneros exceto quando comparado *Bifidobacterium* versus *Lactobacillus*.

Os resultados obtidos a partir da qPCR demonstram que o gênero *Clostridium* se apresenta em maior abundância (73,41%), seguido por *Bacteroides* (17,21%), *Bifidobacterium* (7,10%) e *Lactobacillus* (2,28%) considerando todas as participantes do estudo (70 mulheres) como apresentado pela figura 10.

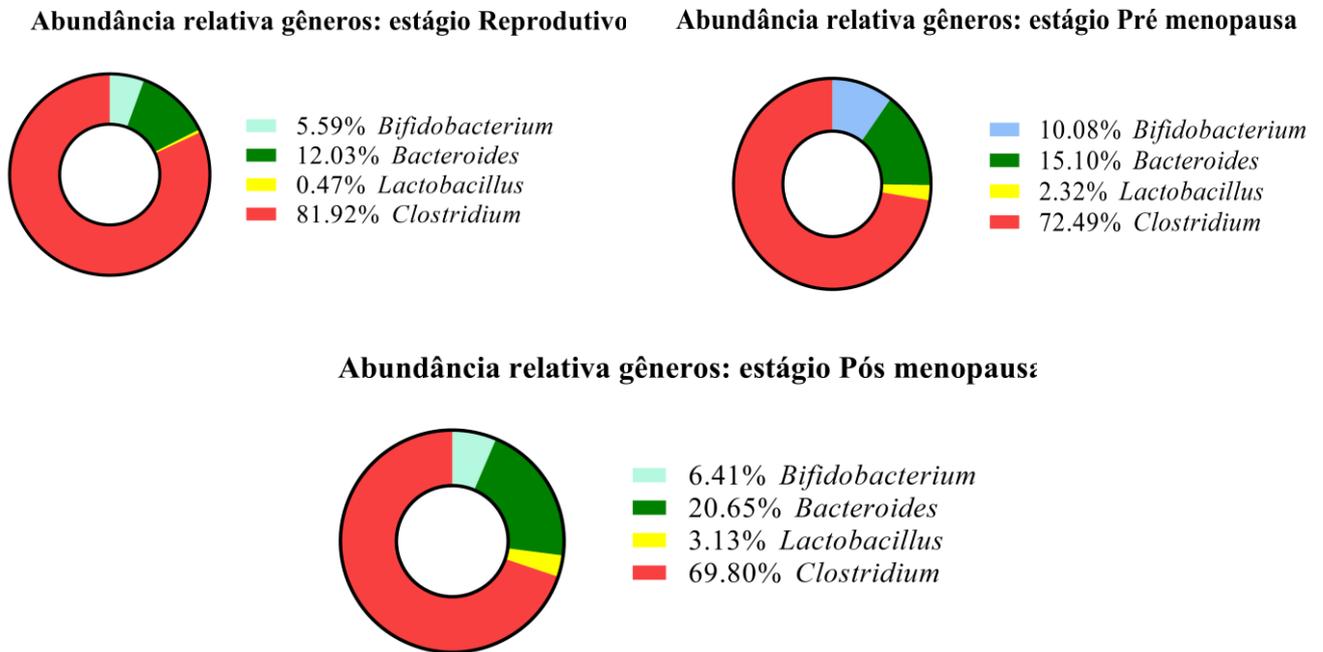
Figura 10: Percentual dos gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium* na população total avaliada



Fonte: Elaboração Própria

Ao avaliar a quantidade dos gêneros por estágio reprodutivo pode-se verificar que o gênero *Clostridium* é evidentemente maior em todos os estágios, porém no estágio Reprodutivo ele prevalece em 81,9% seguido por *Bacteroides* com 12,03%. É observado um aumento do gênero *Lactobacillus* conforme o avanço do climatério sendo representado por 0,47% em fase reprodutiva, em Pré menopausa 2,32% e na pós menopausa chegando a 3,13%. Outro fato ilustrado é o aumento do gênero *Bacteroides* em mulheres na pós menopausa (20,6 %). Esses resultados são apresentados pela figura 11 (a,b,c).

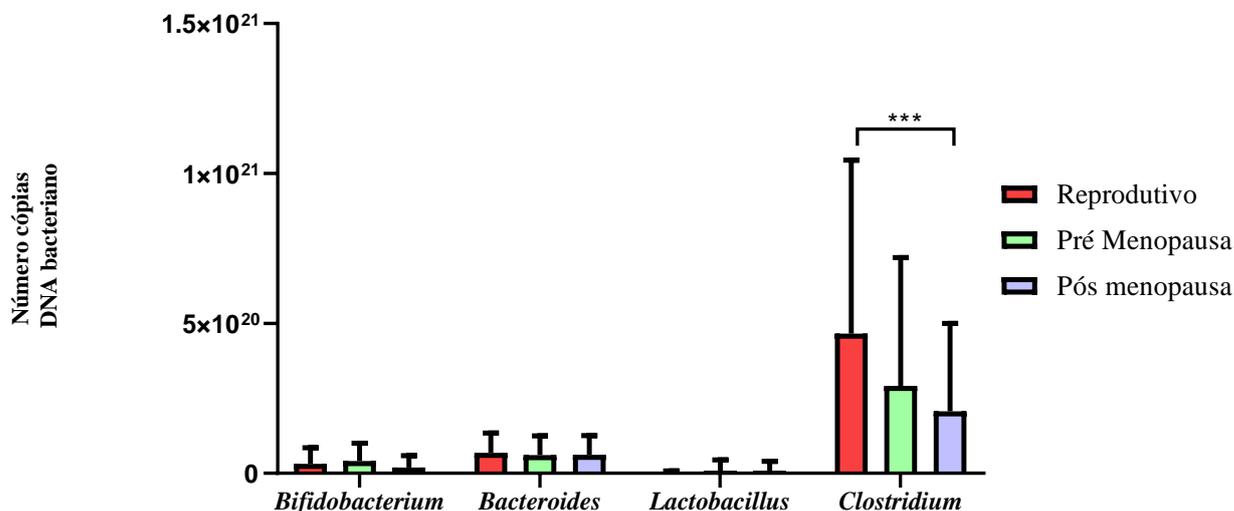
Figura 11: Percentual dos gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium* nos estágios reprodutivo (a), pré menopausa (b) e pós menopausa (c)



Fonte: Elaboração Própria

Avaliando a quantificação dos quatro gêneros e fazendo uma análise comparativa entre os grupos de mulheres foi observado que *Clostridium* apresentou maior número de cópias de DNA em relação aos demais gêneros e também foi o único que apresentou diferença significativa entre os grupos reprodutivo e pós menopausa conforme destacado na figura 12.

Figura 12: Análise comparativa dos gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium* dentre os estágios de envelhecimento reprodutivo



Realizado Two Way ANOVA com pós teste de Tukey para múltiplas comparações onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Verificado diferença estatística entre a fase reprodutiva e pós menopausa em relação a quantidade de número de cópias de DNA bacteriano do gênero *Clostridium* (p valor 0,0003). Dados não paramétricos, porém, para melhor visualização representados em gráficos de barras.

6.7 Correlação entre os gêneros e parâmetros bioquímicos

A Tabela 5 apresenta as análises de correlação realizadas utilizando os valores encontrados para *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium* pelo método de qPCR para buscar possíveis correlações com as variáveis bioquímicas encontradas nas participantes do estudo. Foi observada um associação significativa de *Bifidobacterium* e *Bacteroides* com o hormônio FSH em mulheres do grupo reprodutivo. Outra correlação apresentada foi de *Lactobacillus* e os níveis de Cálcio em mulheres do grupo pré menopausa.

Tabela 5: Análise de correlação entre os gêneros bacterianos quantificados por qPCR e as variáveis bioquímicas dos grupos reprodutivo, pré menopausa e pós menopausa.

Reprodutiva		Variáveis bioquímicas												
Gêneros	HDL	LDL	CT	VLDL	TG	β- estradiol	FSH	LH	TSH	Gli	Ur	Ca	Crea	AU
<i>Bifidobacterium</i>	-0.210	0.353	0.327	0.341	0.337	0.271	0.642*	0.200	0.287	-0.556	-0.105	0.243	0.042	-0.019
<i>Bacteroides</i>	0.055	0.167	0.203	0.101	0.091	0.071	0.656*	0.268	0.323	-0.634	-0.116	-0.063	-0.092	-0.237
<i>Lactobacillus</i>	0.182	-0.344	-0.294	-0.229	-0.217	0.191	-0.173	-0.209	0.373	0.073	0.073	0.002	-0.403	-0.376
<i>Clostridium</i>	0.266	-0.086	-0.019	-0.182	-0.188	-0.180	0.036	-0.137	0.132	-0.227	-0.057	-0.307	-0.128	-0.291

Pré menopausa		Variáveis bioquímicas												
Gêneros	HDL	LDL	CT	VLDL	TG	β- estradiol	FSH	LH	TSH	Gli	Ur	Ca	Crea	AU
<i>Bifidobacterium</i>	-0.130	0.330	0.319	0.355	0.363	0.030	-0.053	-0.016	0.013	0.057	-0.552	-0.034	-0.224	-0.463
<i>Bacteroides</i>	-0.225	-0.143	-0.172	-0.002	0.004	-0.086	-0.104	-0.140	-0.150	0.212	-0.467	-0.068	-0.432	-0.417
<i>Lactobacillus</i>	-0.355	-0.014	-0.076	0.259	0.268	-0.293	0.304	0.043	0.268	0.321	-0.054	0.526 [#]	0.155	0.285
<i>Clostridium</i>	-0.426	-0.363	-0.413	0.413	0.420	-0.128	-0.424	-0.393	-0.063	0.063	-0.143	-0.254	-0.239	-0.380

Pós menopausa		Variáveis bioquímicas												
Gêneros	HDL	LDL	CT	VLDL	TG	β- estradiol	FSH	LH	TSH	Gli	Ur	Ca	Crea	AU
<i>Bifidobacterium</i>	-0.009	-0.017	-0.046	0.042	0.038	-0.153	-0.001	-0.093	0.021	-0.146	0.061	-0.235	0.123	-0.195
<i>Bacteroides</i>	-0.185	0.198	0.204	0.193	0.189	-0.167	-0.015	0.021	0.142	0.074	0.174	0.187	0.220	-0.144
<i>Lactobacillus</i>	-0.041	-0.066	-0.118	0.035	0.040	0.146	-0.158	-0.022	-0.177	0.134	-0.276	-0.078	-0.143	-0.044
<i>Clostridium</i>	-0.100	0.197	0.207	0.067	0.057	0.066	-0.176	-0.109	-0.077	-0.101	-0.213	0.131	-0.081	-0.192

*Correlação Pearson com associação significativa entre as variáveis em fase reprodutiva (*Bifidobacterium* e FSH p:0,0372) (*Bacteroides* e FSH p: 0,0322).

[#]Correlação Spearman com associação significativa entre as variáveis em fase Pré menopausa (*Lactobacillus* e cálcio p: 0,0438).

Nota: HDL= lipoproteína de alta densidade; LDL= lipoproteína de baixa densidade; CT= colesterol total; TG= Triglicérides; FSH= Folículo estimulante; LH= Hormônio Luteinizante; TSH= Hormônio tireoide estimulante; GLI= Glicose; UR= Ureia; CA= Cálcio; CREAT= Creatinina; AU= Ácido úrico.

6.8 Caracterização preliminar do microbioma fecal de mulheres utilizando abordagem metagenômica

Após o sequenciamento os dados foram gerados em formato FASTQ e análises seguintes realizadas através do software QIIME 2 e do banco de dados rRNA Silva conforme descrito em materiais e métodos. A Tabela 6 apresenta o número de *reads*, bem como seu tamanho médio expresso em nucleotídeos. Foram obtidas em torno de 60 a quase 90 mil *reads*

por amostra, utilizando Phred20. A amostra com menor número apresentou 65 mil *reads* enquanto a de maior número 89 mil *reads*.

Tabela 6: Número de *reads* totais geradas por amostra provenientes do sequenciamento

	Amostra	Nº Reads (Phred20)	Sequence length
Reprodutivo	M28	88064	248-430
Pré menopausa	M17	80502	284-430
Pós menopausa	M01	82485	305-430
	M03	65820	265-430
	M06	89788	220-430
	M09	83685	251-430
	M12	67446	286-430
	M16	79076	284-430
	M19	83879	302-430

Fonte: Elaboração própria

Os dados apresentados na tabela 7 correspondem ao número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) identificadas pela análise do sequenciamento. Foram identificadas no total 1733 (OTUs) e a sua distribuição conforme os níveis filo, classe, ordem, família, gênero e espécie.

Tabela 7: OTUs identificadas e sua distribuição conforme o nível taxonômico

Nível Taxonômico	nº Classificados	%
Domínio	1733	100.0
Filo	1727	99.6
Classe	1722	99.3
Ordem	1665	96.0
Família	1640	94.6
Gênero	1365	78.7
Espécie	664	38.3

Para as análises posteriores as amostras M17 (reprodutivo) e M28 (Pré menopausa) foram agrupadas e representadas na tabela 8 como Pré menopausa. Posteriormente avaliamos a frequência dos gêneros utilizando como critério o número maior ou igual a 200 reads. São descritos os 13 gêneros mais abundantes e os resultados foram expressos de acordo com a frequência (%) que cada um dos gêneros aparece no grupo Pré menopausa e Pós menopausa, como apresentado pela Tabela 8.

O gênero *Escherichia-Shigella* se apresentou de maneira mais frequente em Pós menopausa (91,7%), seguido de *Prevotella* (91,6%) e *UCG-002* (80,6%). No grupo Pré menopausa foi verificada que o gênero *Dialister* se apresentou 69,2% dentro das amostras, seguido pelo gênero *Subdoligranulum* (56,4%) e *Eubacterium/coprostanoligenes* (48,4%).

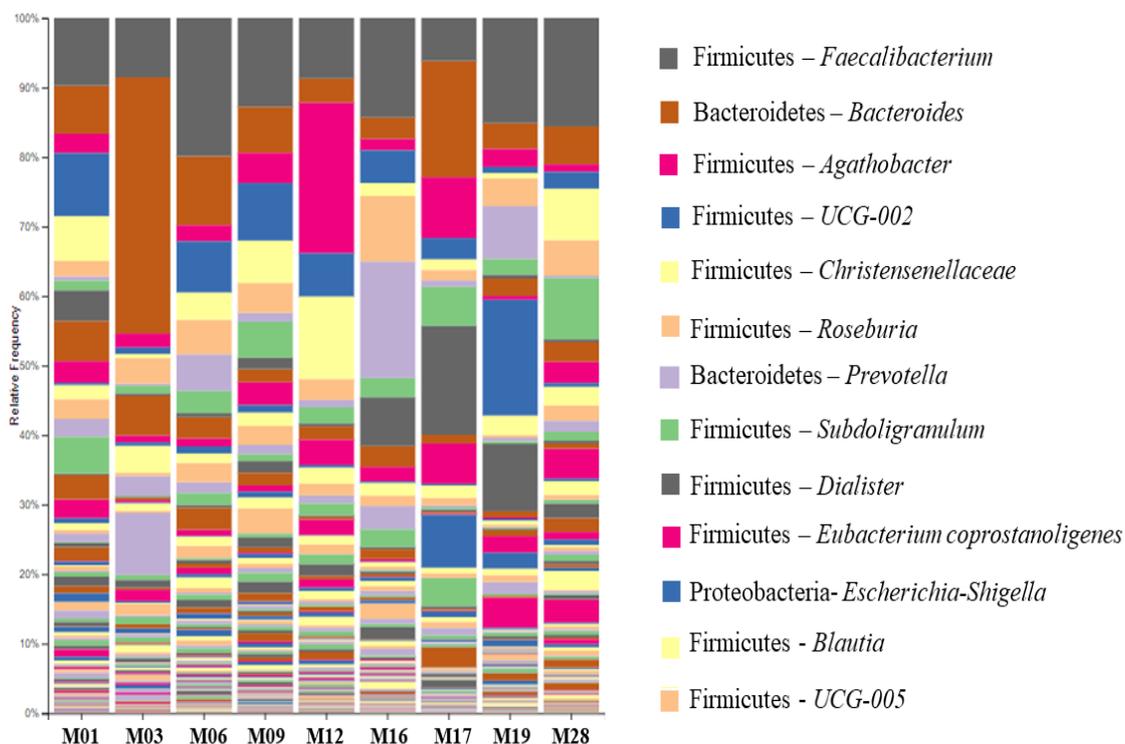
Tabela 8: Gêneros bacterianos encontrados mais frequentes nos grupos pré menopausa e pós menopausa

Gênero	Frequência % Pré menopausa (Reprodutivo e Pré menopausa)	Frequência % Pós menopausa
<i>Faecalibacterium</i>	32.6	67.4
<i>Bacteroides</i>	41.8	58.2
<i>Agathobacter</i>	26.5	73.5
<i>UCG-002</i>	19.4	80.6
<i>Christensenellaceae</i>	30.2	69.8
<i>Roseburia</i>	29.6	70.4
<i>Prevotella</i>	8.4	91.6
<i>Subdoligranulum</i>	56.4	43.6
<i>Dialister</i>	69.2	30.8
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	48.4	51.6
<i>Escherichia-Shigella</i>	8.3	91.7
<i>Blautia</i>	35.6	64.4
<i>UCG-005</i>	31.2	68.8

Fonte: Elaboração próprias

A figura 13 traz uma representação visual a nível taxonômico de gênero da composição de cada amostra. Os gêneros que se apresentaram mais frequentes pertencem aos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*.

Figura 13: Representação da composição da microbiota fecal a nível de gênero nas amostras analisadas por sequenciamento.



Representação esquemática da composição da microbiota fecal das nove amostras analisadas por sequenciamento. O esquema de cores destaca os 13 gêneros que se apresentaram mais frequentes. Grupo reprodutivo M17; Grupo Pré menopausa M28; Grupo Pós menopausa M01, M03, M06, M09, M12, M16, M19.

6.9 Predição Metabolômica

Analisando os 13 gêneros mais frequentes nas amostras foi possível gerar predições metabolômicas relacionadas a esses gêneros. Pela limitação do N amostral apresentamos nas tabelas abaixo o enriquecimento de vias encontrados através do KEGG Enzyme Collection e KEGG PATHWAY (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>).

Quadro 3: Predição das vias metabólicas encontrados no KEGG presentes nas amostras sequenciadas

Entrada	Nome	Função
Naglipasyn-PWY	lípidio-A-dissacárideo sintase	Biossíntese de lipopolissacarídeos Biossíntese de ácidos graxos e lipídios
o'antigen-pwy	Biossíntese de blocos de construção de antígeno - O (<i>E. coli</i>)	Biossíntese carboidratos Biossíntese açúcares
PWY-1269	Biossíntese de CMP-3-desoxi-D- manno -octulosonato	Biossíntese hidratos de carbono Biossíntese Polissacarídeos
PWY-5695	Degradação da inosina 5'-fosfato	Degradação de Nucleotídeos de Purina
PWY6353	Degradação de nucleotídeos de purina II (aeróbia)	Degradação de Nucleotídeos de Purina
PWY 6467	Transferência de Kdo para lípideo IV _A III	Biossíntese Estrutura celular Biossíntese Lipopolissacarídeo
PWY-6895	Biossíntese de difosfato de tiamina II	Biossíntese de Vitaminas Biossíntese de Tiamina
PWY 1297	Degradação dos desoxirribonucleosídeos da purina	Degradação de Nucleosídeos e Nucleotídeos
PWY 1298	Biossíntese de L-alanina I	Biossíntese Aminoácido biossíntese L-alanina

Quadro 4: Predição das enzimas encontradas no KEGG presentes nas amostras sequenciadas

Entrada	Nome	Função
EC2.4.99.12	Lípideo IVA 3-desoxi-D-manno-octulosônico transferase de ácido	Biossíntese de lipopolissacarídeo.
EC4.2.1.35	(R) -2-metilmalato desidratase	Metabolismo de isoleucina valina
EC4.1.3.36	1,4-dihidroxi-2-naftoil-CoA sintase	Síntese de metabólito que leva à biossíntese de menaquinona (vitamina K ₂ , em bactérias)
EC2.7.6.3	2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildi-hidropteridina difosfoquinase	Vias Biosintética do folato (bactérias, plantas e fungos).
EC2.3.3.13	2-isopropilmalato sintase	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina Metabolismo de piruvato
EC2.1.1.185	23S rRNA (guanosina2251-2'-O) -metiltransferase	Catalisa metilação no domínio da peptidiltransferase do rRNA 23S

EC2.5.1.55	3-desoxi-8-fosfooctulonato sintase	Biossíntese de lipopolissacarídeo Biogênese da membrana externa bacteriana.
EC3.1.3.45	3-desoxi-mano-octulosonato-8-fosfatase	Biossíntese de lipopolissacarídeo
EC2.7.7.38	3-desoxi-mano-octulosonato citidililtransferase	Incorporação do lipopolissacarídeo em bactérias Gram-negativas.
EC4.2.1.33	3-isopropilmalato desidratase	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina
EC1.1.1.85	3-isopropilmalato desidrogenase	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina Metabólitos secundários
EC6.3.4.20	7-ciano-7-deazaguanina sintase	Biossíntese de folato metabolismo da purina.
EC2.7.2.1	acetato quinase	Metabolismo de Taurina e Hipotaurina Metabolismo Piruvato Metabolismo microbiano em diversos ambientes
EC3.6.1.13	ADP-ribose difosfatase	Metabolismo de purinas
EC2.4.1.4	amilossucrase	Metabolismo de amido e sacarose
EC5.3.1.13	arabinose-5-fosfato isomerase	Metabolismo de carboidratos e Lipopolissacarídeos
EC4.3.1.1	aspartase	Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato.
EC2.3.1.41	beta-cetoacil-ACP sintase I	Biossíntese de ácidos graxos (araquidonato, palmitato)
EC2.6.1.42	transaminase de aminoácidos de cadeia ramificada	Metabolismo de cisteína, metionina Biossíntese de Valina, Leucina, isoleucina Biossíntese de Pantotenato Biossíntese de metabólitos secundários
EC2.7.8.5	CDP-diacilglicerol - glicerol-3-fosfato 3-fosfatidiltransferase	Metabolismo de glicerofosfolípídeo
EC4.6.1.17	piranopterina cíclica monofosfato sintase	Biossíntese de Folato
EC5.3.1.28	D-sedoheptulose 7-fosfato isomerase	Biossíntese de lipopolissacarídeo
EC3.1.21.2	desoxirribonuclease IV	Inicia a síntese de reparo de DNA em sítios AP
EC2.3.1.57	Diamina N- acetiltransferase	Metabolismo de arginina e Prolina Degradação da espermina e espermidina I
EC4.1.2.25	Dihidroneopterina aldolase	Biossíntese de folato
EC2.5.1.15	Dihidropteroato sintase	Vias Biossintéticas do folato
EC4.2.1.9	Dihidroxi-ácido-desidratase	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina Biossíntese de pantotenato e CoA
EC2.7.1.30	Glicerol quinase	Enzima chave na regulação da captação e metabolismo do glicerol.
EC2.7.13.3	Histidina quinase	Detecta o estresse hídrico

		Regulador positivo das respostas à seca e ao estresse salino e sinalização do ácido abscísico (ABA).
EC1.1.1.23	Histidinol desidrogenase	Metabolismo de histidina
EC1.7.1.10	Hidroxilamina redutase	Metabolismo de Nitrogênio
EC4.2.1.19	Imidazoleglicerol-fosfato desidratase	Processo biossintético da histidina
EC2.3.1.241	Lauroiltransferase da biossíntese de lipídeo A	Biossíntese de Lipopolissacarídeo
EC1.1.1.86	cetol-ácido redutoisomerase (NADP +)	Envolvido na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA).
EC3.2.1.65	levanase	Metabolismo de amido e sacarose
EC2.4.1.182	lipídeo-A-dissacárido sintase	Biossíntese de lipopolissacarídeo
EC2.4.99.12	lipídeo IVA 3-desoxi-D-manno- octulosônico transferase de ácido	Biossíntese de lipopolissacarídeo
EC5.3.1.8	manose-6-fosfato isomerase	Metabolismo Frutose e manose
EC6.3.4.21	nicotinato de fosforibosiltransferase	Metabolismo de nicotinato e nicotinamida
EC6.2.1.26	o-succinilbenzoato --- CoA ligase	Ubiquinona e outra biossíntese de terpenóide-quinona
EC7.3.2.1	transportador de fosfato ABC	ligação de ATP do sistema de transporte de fosfato
EC3.5.4.19	fosforibosil-AMP ciclo- hidrolase	Metabolismo de histidina Biossíntese de metabólitos secundários
EC7.6.2.11	transportador ABC de poliamina	Enzima bacteriana que importa putrescina e espermidina.
EC1.3.1.12	hidroxifenilpiruvato sintase	Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano Biossíntese de Novobiocina
EC1.7.1.13	preQ1 sintase	Biossíntese de Folato
EC3.4.21.26	enzima de clivagem pós-prolina	Atua em ligações peptídicas (peptidases)
EC1.2.1.87	propanal desidrogenase	Degradação do colesterol. Catalisa a conversão de propanal em propanoil-CoA, usando NAD ⁺ e coenzima A
EC1.3.3.4	protoporfirinogênio oxidase	biossíntese de protoporfirina-IX metabolismo dos compostos contendo porfirina.
EC2.7.9.3	selenofosfato sintase	Metabolismo de selenocomposto
EC2.7.1.130	lipídeo-A 4'-quinase	Biossíntese de lipopolissacarídeo
EC2.7.4.16	tiamina-fosfato quinase	Metabolismo Tiamina
EC2.3.1.191	UDP-3-O- (3-hidroximiristoil) glucosamina N-aciltransferase	Biossíntese de Lipopolissacarídeo
EC3.5.1.108	UDP-3-O-acil-N-acetilglucosamina desacetilase	Biossíntese de Lipopolissacarídeo

7 DISCUSSÃO

As mulheres vêm apresentando uma expectativa de vida maior e essa longevidade exerce impactos importantes em sua saúde que diferem não só pela questão cronológica, mas também pelos efeitos bioquímicos, metabólicos, hormonais e psicossociais durante o seu tempo de vida. Nosso estudo reuniu um total de 70 mulheres residentes na cidade de Ouro Preto - Minas Gerais, em fase de climatério ocorrido de maneira natural as quais foram designadas em três grupos conforme critérios de envelhecimento reprodutivo (HARLOW *et al.*, 2012) que vem sendo utilizado em diversos estudos como ferramenta para auxiliar na caracterização do climatério e menopausa (HANSEN *et al.*, 2012; MARLATT; BEYL; REDMAN, 2018; WANG *et al.*, 2018).

Para trazer um suporte a este, bem como a outros projetos em andamento, o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) juntamente com seus colaboradores, deram início a um projeto de extensão na cidade de Ouro Preto, cujo foco são essas mulheres que vivenciam a fase do climatério. O projeto “Microbiota e saúde da mulher no climatério” traz a proposta de um acompanhamento a longo prazo dessas participantes, auxiliando e orientando sobre a importância de conhecer e manter uma microbiota intestinal equilibrada para uma melhor qualidade de vida nessa fase do climatério.

A microbiota da mulher vem sendo investigada e descrita em importantes estudos e muitos desses se concentravam em analisar a microbiota vaginal das mulheres em diversas fases de sua vida (BROTMAN *et al.*, 2014; KAUR *et al.*, 2020; MUHLEISEN; HERBST-KRALOVETZ, 2016). Já a microbiota intestinal vem sendo conhecida como o “segundo genoma humano” devido à complexidade e pelo potencial de influenciar condições de saúde e/ou doença nos seres humanos. No Brasil apesar de estar em ascensão, os estudos sobre a microbiota da população ainda são escassos quando comparado a outros países.

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a microbiota intestinal de mulheres em fase de climatério concentrando os esforços em conhecer a ação dessa microbiota no organismo feminino. Entretanto, foi necessário construir a coorte, por meio de sensibilização de mulheres para participar deste projeto, utilizando os contatos do Programa Âmbar. O Âmbar foi elaborado em 2013 por professores da escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto e atua auxiliando em assuntos relacionados a saúde da mulher através de ações que envolvem a comunidade acadêmica e as equipes de saúde da família, interagindo com a comunidade na cidade e promovendo auxílio voltado para prevenção e proteção da saúde da mulher.

As participantes deste projeto possuíam entre 40 e 65 anos e a maior parte estava concentrada em pós menopausa com a média de 54,6 anos de idade (Tabela 1). A relação entre sintomas apresentados no climatério e o estado menopausal vem sendo alvo de investigações na literatura, e em nosso estudo a ocorrência dos sintomas foi avaliado através da escala MRS sendo observado que a maior intensidade dos sintomas foi encontrada em mulheres na Pré menopausa seguido por aquelas em pós menopausa, corroborando com um estudo realizado em Campinas onde LUI FILHO (2015) e colaboradores também observaram sintomatologia intensa nessas duas fases.

Nosso estudo identificou que a ocorrência de sintomas psicológicos de forma intensa foi relatada por 53% das mulheres em Pré menopausa, enquanto 36% em Pós menopausa relataram esses sintomas com intensidade moderada. Essa sintomatologia psicológica abrange a ocorrência de depressão, irritabilidade, ansiedade e exaustão que está relacionado com um maior risco de depressão em mulheres conforme apresentado em um estudo realizado no Rio de Janeiro por Santos (2014).

É necessário destacar que existe um amplo relato na literatura indicando que as mudanças hormonais ocorridas em mulheres em fase de climatério podem ser fatores contribuintes para que esses sintomas psicológicos apareçam e se agravem, porém é importante considerar também o efeito da pandemia sobre essas mulheres pois a diminuição das interações sociais e o fato de não poder realizar atividades rotineiras pode ser também um agravante para a grande ocorrência de sintomas psicológicos encontrados nas mulheres deste estudo (ALI; AHMED; SMAIL, 2020; MARTIN et al., 2018)

Sintomas urogenitais também se apresentaram em destaque na população deste estudo. Tais sintomas envolvem alterações urológicas, ressecamento vaginal, dispareunia. Foi averiguado neste estudo que 60% das mulheres em Pré menopausa relataram esses sintomas de maneira intensa (Figura 5), e naquelas que se encontravam em Pós menopausa 41% descreveram a presença dos sintomas moderadamente (Figura 6), nosso dado difere de alguns estudos que encontram maior ocorrência desses sintomas no período de Pós menopausa onde a maior redução estrogênica é ligada a ocorrência das alterações urogenitais (KINGSBERG *et al.*, 2013; NAPPI; PALACIOS, 2014). A possibilidade que as diferenças observadas podem ser resultado de hábitos associados a uma diferente cultura será futuramente investigado. Entretanto, não podemos deixar de considerar que seja por falta de conhecimento ou até mesmo pelo receio da exposição, muitas mulheres não procuram auxílio para combater esses sintomas o que normalmente leva a um agravamento no quadro clínico. É importante que a equipe de

saúde aborde de maneira adequada esse assunto e as formas de tratamento disponíveis para minimizar tais transtornos (NAPPI; KOKOT-KIEREPA, 2012; KINGSBERG *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que nosso estudo se desenvolveu no período de 2019 a 2021, sendo que em Janeiro de 2020 a OMS declarou estado de pandemia pela disseminação do coronavírus Sars-Cov-2 que acarreta a doença Covid-19 com manifestações clínicas que podem variar de assintomáticas, sintomas leves (febre, cansaço, tosse) ou quadros mais graves (febre alta, pneumonia e dispnéia) que pode levar a morte de indivíduos acometidos (THE LANCET ONCOLOGY, 2020). O isolamento social foi uma das medidas extremamente importantes adotada para conter o avanço do vírus e alguns estudos no Brasil relatam o efeito do isolamento no aumento de ocorrência de sintomas psicológicos na população (VITORINO *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021). Assim, acreditamos que esse contexto pode, pelo menos em parte, ter agravado os sintomas.

Avaliando os parâmetros bioquímicos e comparando-os entre os três grupos de mulheres (Tabela 3) foi observado que não havia diferença em relação ao perfil lipídico e suas frações, porém foi constatado que o colesterol total se encontrava elevado de acordo com a última atualização das Diretrizes sobre dislipidemias e Prevenção de aterosclerose, descrita pela Sociedade Brasileira de Cardiologia em 2017 (FALUDI *et al.*, 2017). O recomendado para adultos acima de 20 anos é que o colesterol total esteja abaixo de 190 mg/dL, o que não ocorreu nas mulheres que participaram desse estudo.

Em nosso estudo a fase de maior elevação do colesterol total foi na Pós menopausa coincidindo com estudo realizado por Fonseca (2019) e colaboradores em uma coorte de 1916 mulheres brasileiras, em que foi encontrado maior aumento de colesterol total predominante em pós menopausa. Nosso dado também corrobora com pesquisas realizadas em mulheres de outros países como por exemplo na China, onde alterações em perfis lipídicos também foram encontradas, sendo observado o aumento do colesterol total em mulheres com menopausa tardia e em pós menopausa (CHOI *et al.*, 2015). Um estudo longitudinal do Reino Unido investigou a associação de alguns metabólitos com o estágio reprodutivo das mulheres e sugeriu que alterações ligadas ao metabolismo de lipídeos possuem uma relação com a transição para a menopausa (WANG *et al.*, 2018).

Pesquisas mais recentes tem como foco identificar os perfis lipídicos de maneira mais detalhada considerando não só a medida dos níveis circulantes, mas também a composição das partículas lipídicas e alguns autores destacam a menopausa como um fator causal nessas alterações do perfil lipídico que podem levar a doenças cardiovasculares trazendo maiores prejuízos a saúde da mulher (AURO *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2012). Em nossa coorte avaliada a

investigação dessas partículas lipídicas por abordagens específicas pode contribuir para uma avaliação mais criteriosa acerca de predisposição para outras doenças.

Nossos dados mostraram que níveis de creatinina não apresentaram diferença entre os grupos analisados, enquanto a ureia foi diferente estatisticamente entre mulheres na fase reprodutiva e pré menopausa ($p= 0,0218$) e também com as mulheres em pós menopausa ($p=0,0050$) (Tabela 3). Apesar de todos os três grupos apresentarem níveis de ureia e creatinina dentro do valor de referência, o grupo Pós menopausa apresentou maiores níveis desses dois analitos em comparação com as outras mulheres. Creatinina e ureia são usadas em conjunto na avaliação das funções renais uma vez que lesões nesse órgão podem levar ao acúmulo dos mesmos no organismo o que pode auxiliar no diagnóstico de condições que comprometem o funcionamento renal (ALMEIDA, 2014). É necessário ressaltar que a avaliação e acompanhamento desses marcadores é importante pois doenças renais em mulheres na pós menopausa está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ARCE *et al.*, 2016).

Outro parâmetro analisado foi o ácido úrico que mostrou maior valor no grupo Pré menopausa ($5,46 \pm 1,78$) apresentando diferença significativa em relação as mulheres na fase reprodutiva (Tabela 3). O ácido úrico é proveniente do metabolismo final de purinas em humanos e seus níveis podem ser influenciados pelo tipo de dieta consumida. A hiperuricemia tem se mostrado relacionada com ocorrência de condições como diabetes mellitus, doença renal crônica, hipertensão (FOUAD; FATHY; ZIDAN, 2016). Estudos que avaliaram níveis de ácido úrico correlacionam seu aumento na circulação com desenvolvimento de Síndrome metabólica em mulheres na Pós menopausa (GOUVEA, 2016; HE *et al.*, 2017), e apesar das pesquisas relacionando ácido úrico e mulheres em fase de climatério serem escassos, já é descrito que níveis aumentados de AU está associado a menopausa (HAK; CHOI, 2008).

Ao avaliar os níveis de cálcio sérico foi visto uma diferença entre mulheres em fase reprodutiva para a aquelas em Pós menopausa, sendo que esse último grupo apresentava níveis de cálcio maiores em relação aos outros dois grupos (Tabela 3). O cálcio é componente essencial para manter a saúde neurológica, funções cardíacas e principalmente para remodelação óssea (JAFARI-GIV *et al.*, 2019). Com a chegada da menopausa o hipostrogenismo possui relação com aumento da remodelação óssea ocorrendo uma diminuição na densidade mineral óssea e posteriormente a osteoporose como avaliado em grandes coortes (CAULEY *et al.*, 2012; GUTHRIE *et al.*, 2004). A redução do estrogênio também diminui a absorção intestinal do cálcio e retarda a formação óssea (LI; WANG, 2018).

O cálcio vem sendo descrito como importante componente para minimizar e auxiliar na prevenção de osteoporose, Napoli *et al.*, (2007) cita benefícios do cálcio proveniente da dieta auxiliando no metabolismo ósseo. Também há uma perspectiva que as mulheres que fazem a terapia para reposição hormonal na menopausa e realizam a suplementação com cálcio e vitamina D tem uma redução significativa em fraturas ósseas (ROBBINS *et al.*, 2014). Em nosso grupo avaliado os níveis de cálcio se apresentaram de acordo com métricas de referência utilizada para adultos, porém com a relação já conhecida da diminuição hormonal característica do climatério e a ocorrência de osteoporose é importante manter um acompanhamento e nova avaliação desse parâmetro e outros que possam complementar conforme ocorre o avanço do período de menopausa.

Ao propor uma assistência para as participantes deste projeto, visualizamos uma necessidade da aplicação de um método mais acessível, mais ágil, e com confiabilidade para acompanhamento da microbiota intestinal. Atualmente o Sequenciamento de Nova Geração é padrão Ouro para esse diagnóstico (VAN DIJK *et al.*, 2014), porém ainda demanda maiores recursos quando comparada a técnica de qPCR que foi a proposta que utilizamos para conhecer e acompanhar a microbiota das participantes deste estudo.

A técnica de qPCR forneceu um parâmetro inicial sobre a composição da microbiota intestinal das participantes, pois analisamos quatro gêneros representantes de Filos abundantes nos seres humanos: filo *Firmicutes* (gêneros: *Clostridium* e *Lactobacillus*), filo *Bacteroidetes* (gênero: *Bacteroides*), filo *Actinobacteria* (gênero: *Bifidobacterium*). Importante discorrer que essa abordagem molecular vem sendo utilizada para fins de identificação da microbiota por outros grupos de pesquisa (KWOK *et al.*, 2014; RINTTILA *et al.*, 2004; SANTOS, 2016).

Considerando todas as participantes do estudo (70 mulheres), o gênero que se apresentou em maior abundância utilizando qPCR foi o gênero *Clostridium* (73,4%) seguido por *Bacteroides* (17,21%), *Bifidobacterium* (7,10%) e *Lactobacillus* (2,28%) (Figura 10) o que difere de estudos que utilizaram a mesma abordagem, como em uma população coreana de adultos saudáveis indicou que o gênero mais abundante foi *Bacteroides*, seguido por *Bifidobacterium* (KOOK *et al.*, 2018). Em outras análises níveis de *Bifidobacterium* também se encontraram reduzidos conforme ocorre o envelhecimento da população (KATO *et al.*, 2017; ODAMAKI *et al.*, 2016).

Já é demonstrado pela literatura a importância desses gêneros analisados, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* vem sendo evidenciados como espécies benéficas para saúde humana que possuem características probióticas. Ações como produção de vitaminas, estimulação do sistema imunológico, melhora na digestão alimentar, proteção contra patógenos

são realizadas por essas taxa bacterianas (RIVIÈRE *et al.*, 2016; ŠTŠEPETOVA *et al.*, 2011). Abundância reduzida de *Bifidobacterium* vem sendo associada a distúrbios gastrointestinais como síndrome do intestino irritável e doença inflamatória intestinal (O'CALLAGHAN; VAN SINDEREN, 2016), já o aumento de espécies de *Lactobacillus* foi associado a presença de diabetes tipo 2 em mulheres com mais de 60 anos de idade (KARLSSON *et al.*, 2013).

Nossas evidências mostraram mudanças significativas no gênero *Clostridium* quando avaliado entre os estágios de envelhecimento reprodutivo da mulher. A quantificação por qPCR mostrou que o grupo pós menopausa possuía menor número de cópias de DNA desse gênero quando comparado aos outros dois grupos (Figura 12). Análise realizada por Santos-Marcos *et al* (2018) mostrou mudanças na microbiota intestinal a nível de filos e alguns gêneros conforme o estado hormonal de mulheres Pré e Pós menopausa. Em modelos animais fêmeas foi também demonstrado essa comunicação e alteração da microbiota relacionada aos hormônios sexuais (MARKLE *et al.*, 2013).

O filo *Firmicutes* considerado abundante nos seres humanos abriga o gênero *Clostridium* que exerce funções importantes como modulação do sistema imune, produção de ácidos biliares que auxiliam na digestão de lipídeos provenientes da dieta (LONG; GAHAN; JOYCE, 2017). Algumas espécies como *Clostridium butyricum* são descritas com propriedades benéficas como descrito por CHEN *et al.*, (2020) que ao avaliar essa bactéria verificou que ela inibiu o desenvolvimento de tumor intestinal em ratos. Já outras espécies de *Clostridium* são amplamente associadas a condições de adoecimento como Síndrome do intestino irritável (SUNDIN *et al.*, 2015), infecções intestinais graves causadas por *Clostridium difficile* (SAMARKOS; MASTROGIANNI; KAMPOUROPOULOU, 2018), e condições mais graves como câncer colorretal (XIE *et al.*, 2017). Nossos resultados de qPCR indicaram maior presença de *Clostridium* na população avaliada, mas para demonstrar se esse aumento é benéfico se faz necessário aprofundar o estudo a nível de espécie. Mantendo a metodologia de qPCR é possível confeccionar *primers* que sejam espécie-específicos para auxiliar nessa investigação, e também pode ser empregado o sequenciamento de Nova Geração para um maior apuração dessas espécies de *Clostridium* o qual se destacou nessa fase que o climatério abrange.

É de suma importância relatar que a diferença significativa encontrada nas quantidades de cada gênero em cada grupo analisado (Figura 12) pode ser proveniente de diversos fatores como dieta, estilo de vida, a faixa etária que essa mulher se encontra, o seu estado de saúde geral (RAZAVI *et al.*, 2019). Também devemos destacar que o grande acontecimento que difere as fases do climatério são as alterações de estrogênio, FSH, essas alterações nos estrogênios e seus metabólitos podem influenciar o número de espécies da microbiota intestinal (FLORES *et*

al., 2012). Outro fato a ser elucidado em nossa coorte é se os níveis circulantes de estrogênio sofreram ações de bactérias com ação de β -glucuronidase, que desconjuga estrogênios promovendo sua reabsorção, já que os quatro gêneros quantificados possuem essa ação.

Como uma análise preliminar buscamos correlações estabelecidas entre os níveis bacterianos quantificados por qPCR e os parâmetros bioquímicos encontrados nos grupos. Nossa análise encontrou correlações positivas significativas no grupo Reprodutivo para o gênero *Bifidobacterium* e FSH (r: 0,642 p=0,0372) e *Bacteroides* e FSH (r: 0,656 p=0,0322) (Tabela 5). Foi relatado anteriormente que esses dois gêneros estão correlacionados com os níveis de FSH em condições como Insuficiência ovariana prematura (POI), uma síndrome ovariana que ocorre antes dos 40 anos nas mulheres, e tanto *Bifidobacterium* quanto *Bacteroides* encontravam-se aumentados em mulheres portadoras de POI em relação às mulheres que não possuíam essa condição (WU *et al.*, 2021). Outras análises associam o aumento de espécies *Bacteroides* ao desenvolvimento de Síndrome do ovário Policístico (SOP), um distúrbio endócrino e metabólico frequente em mulheres (LIU *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2021).

Os estudos encontrados não relatam essa correlação em mulheres no climatério como ocorreu em nossa coorte, porém eles descrevem essa alteração na microbiota de mulheres que passam por grandes processos de mudanças hormonais. Também é descrito que as alterações encontradas nesses gêneros para as patologias POI e SOP contribuem para resistência insulínica, obesidade e desenvolvimento de processos inflamatórios (LIU *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021) o que nos sugere uma suspeita que esses mecanismos também possam ocorrer ou estar presentes em mulheres no climatério decorrente de alterações em *Bifidobacterium* e *Bacteroides* mas para tal confirmação é necessário aprofundar as investigações em nosso grupo de estudo.

Outra correlação significativa que encontramos foi no grupo pré menopausa, onde houve associação de *Lactobacillus* e níveis de Cálcio sérico (rho: 0,526 p=0,0438) (Tabela 5). O cálcio é essencial no processo de remodelação óssea e seus níveis podem influenciar na ocorrência de osteoporose (JAFARI-GIV *et al.*, 2019). Espécies de *Lactobacillus* conhecidas são descritas por desempenhar funções probióticas no organismo humano dentre elas auxiliar na manutenção óssea estimulando a absorção de cálcio por células intestinais (NARVA *et al.*, 2004).

Outro mecanismo sugerido é que *Lactobacillus* auxiliam na manutenção da permeabilidade intestinal e na produção de ácidos graxos de cadeia curta, ambos mecanismos que contribuem para absorção do cálcio colaborando com a manutenção óssea (XU *et al.*, 2017).

Uma espécie considerada nativa do trato intestinal humano o *Lactobacillus reuteri* foi suplementada em ratas ovariectomizadas e com níveis reduzidos de estrogênio, e promoveu melhora da saúde óssea (BRITTON *et al.*, 2014).

Alguns grupos de pesquisadores associam microbiota intestinal com a alterações ósseas em mulheres na pós menopausa, muitos descrevem que o hipostrogenismo nessa fase influencia as comunidades bacterianas afetando vários aspectos como absorção de cálcio, contribuindo para um estado inflamatório e alterando a remodelação óssea (LI *et al.*, 2019; OZAKI *et al.*, 2021; RETTEDAL *et al.*, 2021). As mulheres que participaram deste estudos apresentaram níveis de cálcio nos parâmetros desejados e essa correlação com níveis de *Lactobacillus* abre caminho para que possamos investigar se tais bactérias tem contribuído para saúde óssea nessas mulheres e podem ser utilizadas como opção para futuras intervenções.

Até onde conhecemos e pesquisamos nosso estudo é o primeiro a quantificar gêneros importantes da microbiota intestinal de mulheres no climatério nessa região de Ouro Preto através da abordagem molecular qPCR e nos mostra os primeiros achados importantes nessa população. Utilizar esse método para acompanhar e auxiliar as mulheres na cidade pode trazer benefícios, orientações e auxiliar na manutenção de uma microbiota inclinada a condições saudáveis, para isso é necessário continuar com esse acompanhamento realizando novos ensaios e investigando novos alvos na microbiota intestinal.

Com as análises de sequenciamento nosso estudo apontou treze gêneros que se apresentaram mais frequentes no grupo pré menopausa e pós menopausa (Tabela 8). Gêneros como *Faecalibacterium* tem sido descritas como promotoras de saúde e seus níveis reduzidos associados a sedentarismo (BRESSA *et al.*, 2017), desenvolvimento de inflamação de baixo grau e obesidade (CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020; WAN *et al.*, 2019) e diabetes mellitus tipo 2 (KARLSSON *et al.*, 2013). A presença desse gênero de forma mais frequente em amostras de pós menopausa é importante visto que a literatura indica patologias como diabetes, obesidade que podem levar a síndrome metabólica uma condição prevalente após a menopausa (PU *et al.*, 2017).

Outro achado importante foi a maior frequência de *Christensenellaceae* em pós menopausa, já que a literatura correlaciona essa família a longevidade humana (BIAGI *et al.*, 2016; KONG *et al.*, 2016), e com a saúde metabólica onde tem-se níveis reduzidos de triglicérides e níveis elevados de HDL (FU *et al.*, 2015). *Christensenellaceae* também é descrita como depletada em indivíduos com síndrome metabólica (HE *et al.*, 2017). A maior frequência desse gênero em pós menopausa é sugestivo de um estado saudável dessas mulheres, uma vez que os níveis de colesterol e triglicérides encontrados estavam descritos nos

parâmetros aceitáveis, contudo como não foram analisados parâmetros que indiquem a presença ou ausência de síndrome metabólica não é possível afirmar que esses grupos analisado não possuíam Síndrome metabólica apenas por apresentar grande frequência desse gêneros.

Gêneros encontrados como *Subdoligranulum* e *Eubacterium coprostanoligenes* ainda necessitam de maiores esclarecimentos sobre sua atuação na saúde humana, mas estudos que investigam *Subdoligranulum* sugerem que o gênero auxilia na saúde metabólica (VAN HUL *et al.*, 2020) enquanto *Eubacterium coprostanoligenes* é descrito por produzir coprostanol a partir de colesterol que é eliminado nas fezes e a presença dessa espécie está associada a níveis reduzidos de colesterol sérico (KENNY *et al.*, 2020). Encontrar esse gênero em nosso grupo de estudos abre um precedente para que seja feita uma análise desse composto coprostanol futuramente bem como avaliar o possível benefício em relação aos metabolismo de lipídeos que é impactado pela redução do estrogênio após o climatério.

Dialister e *Blautia* possuem uma relação com portadores de transtornos como a depressão, ambos os gêneros com seus níveis sub representados quando comparado a controles saudáveis (CHEUNG *et al.*, 2019; VALLES-COLOMER *et al.*, 2019). *Blautia* também é associado em grandes estudos ao acúmulo de gordura visceral (OZATO *et al.*, 2019) e em estudos transversais o aumento em sua abundância está relacionada a Diabetes tipo II (EGSHATYAN *et al.*, 2016). Para nosso estudo *Blautia* se apresentando mais frequente em pós menopausa pode servir de alerta para as condições metabólicas que envolvem o acúmulo de gordura visceral nessas participantes uma vez que esse acúmulo já é favorecido pela queda de estrogênio.

Nossa análise identificou *Bacteroides* e *Prevotella* ambos pertencentes ao Filo *Bacteroidetes*. De acordo com LEY (2016) *Bacteroides* parece prevalecer em povos ocidentais enquanto *Prevotella* em não ocidentais o que vem sendo sugerido como influência da dieta consumida. Já ARUMUGAM e colaboradores (2011) consideram *Bacteroides* como enterótipo I e *Prevotella* como enterótipo II e cada um utiliza diferentes rotas para produção de energia a partir da fermentação no intestino. Estudos pioneiros sobre a microbiota demonstram que alterações no Filo *Bacteroides* como a redução da sua abundância em relação a Filo Firmicutes está associado a uma microbiota de indivíduos obesos (LEY *et al.*, 2006; TURNBAUGH *et al.*, 2006) , contudo ainda há discordância sobre essa questão (FERNANDES *et al.*, 2014).

Outra evidência interessante em nossos achados foi encontrar maior frequência de *Roseburia* e *Agathobacter* no grupo pós menopausa. Em recentes pesquisas o seu enriquecimento foi descrito em casos de remissão da depressão em pacientes que responderam positivamente ao tratamento, na qual através da produção de ácidos graxos de cadeia curta

também são produzidos os neurotransmissores que levam a melhora dessas condições. Isso sugere que ambos os gêneros podem ser candidatos para um tratamento natural de condições que englobam os desordens psicológicas por exemplo (LEE et al., 2021; PARK; CHOI; LEE, 2020). De acordo com nossos resultados provenientes do MRS, o grupo pré menopausa apresentou maior queixa de sintomas psicológicos (figura 5) que podem englobar a depressão, e menor frequência desses gêneros o que abre caminho para investigarmos se há alguma relação que descreva a influência desses dois gêneros nessa coorte avaliada.

A Análise identificou a presença de *Escherichia-Shigella* em grande frequência na pós menopausa o que pode sinalizar um alerta conforme a saúde intestinal dessas mulheres, pois *Escherichia-Shigella* é considerada um patógeno. Sua ação envolve a destruição dos colonócitos causando diarreia moderada e na forma grave (DE JONG; ALTO, 2018). Em nosso trabalho não avaliamos indicadores inflamatórios, porém esse gênero está amplamente associado a padrões inflamatórios intestinais o que necessita de maiores investigações nessa coorte avaliada.

Tão importante quanto conhecer esses gêneros mais abundantes em mulheres no climatério é também conhecer a função exercida por essas bactérias e sua influência no organismo das participantes. Por meio de uma Predição do metaboloma foi possível caracterizar um painel de vias metabólicas (Pathways) e número de comissão de Enzimas (Ecs) que representaram o conjunto de funções importantes para o metabolismo bacteriano e humano.

A predição do metaboloma confirmou a presença de importantes vias para a regulação e homeostase metabólica o que de fato já era esperado. Vias que envolvem síntese e metabolismos de lipídeos, carboidratos, vitaminas estão enriquecidas nas amostras analisadas. Como já relatado pela literatura o período de menopausa com todas as alterações hormonais por si só já acarreta mudanças envolvendo o metabolismo glicolipídico da mulher (WANG et al., 2018), alterações que também envolvam essas vias encontradas podem refletir esse efeito hormonal que a mulher enfrenta nesse período.

Essa primeira análise de caráter exploratório indicou funções da microbiota importantes para manutenção da saúde intestinal uma delas é o metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta, utilizado como fonte de energia pelas células intestinais. Esse achado apoia nossas análises por qPCR em que quantificamos *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* que são grandes produtores de AGCC e também nos gêneros mais frequentes são encontradas bactérias que realizam essa função. É importante ressaltar que realizar a análise futura dos metabólitos provenientes dessa microbiota por meio de espectrometria de massa pode trazer novas descobertas e acrescentar robustez aos dados obtidos através da predição.

Essa análise de predição metabolômica é uma caracterização preliminar dos nossos dados. Foi realizada a partir das nove amostras que foram sequenciadas até o momento, mas com andamento do projeto “ Microbiota e Saúde da Mulher no Climatério” outras 50 amostras serão encaminhadas para o mesmo processo de sequenciamento e análise metabolômica e será utilizado o mesmo pipeline estabelecido no presente estudo, assim dados mais robustos serão gerados possibilitando uma análise mais aprofundada nos permitindo conhecer gêneros e espécies presentes na microbiota importantes para a mulher nessa fase do climatério.

8 CONCLUSÃO

Os principais resultados obtidos neste trabalho foram:

- (i) Os ensaios de qPCR utilizando as amostras fecais mostraram uma alta predominância do gênero *Clostridium* representante do Filo *Firmicutes* em todos os três grupos analisados e a sua quantificação se mostrou diferente estatisticamente entre os grupos reprodutivo e pós menopausa, o que pode ser consequência dos fatores que influenciam a microbiota como dieta, genética, níveis hormonais dentre outros;
- (ii) A correlação entre os gêneros avaliados por qPCR mostrou uma associação significativa entre *Bifidobacterium* e *Bacteroides* com o hormônio FSH no grupo reprodutivo, enquanto *Lactobacillus* se correlacionou com Cálcio sérico nas mulheres em pós menopausa;
- (iii) A análise do sequenciamento e o metaboloma predito indicou os gêneros mais frequentes em pré menopausa e pós menopausa mostrando uma descrição da composição e das funções da microbiota fecal em fase de climatério.

Em conjunto podemos concluir que as mudanças hormonais e glicometabólicas no climatério são acompanhadas por alteração significativas na microbiota fecal, entretanto, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação dessa microbiota sobre o organismo da mulher que vivencia o climatério.

9 PERSPECTIVAS

- Promover a continuidade nas análises da microbiota fecal das mulheres em fase de climatério e menopausa em Ouro Preto, acompanhando as mesmas através do projeto “Microbiota e Saúde da Mulher no climatério.”
- Obter o metaboloma das amostras fecais por meio da metodologia de espectrometria de massas.
- Estabelecer correlações entre o metaboloma e os parâmetros glicometabólicos das mulheres participantes do projeto “Microbiota e Saúde da Mulher no climatério.”

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A. M.; AHMED, A. H.; SMAIL, L. Psychological Climacteric Symptoms and Attitudes toward Menopause among Emirati Women. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 14, p. 5028, 13 jul. 2020.
- ALMEIDA, A. *et al.* A new genomic blueprint of the human gut microbiota. **Nature**, v. 568, n. 7753, p. 499–504, 25 abr. 2019.
- ALMEIDA, M. L. **Dosagem de ureia e creatinina em soro humano através da técnica de espectroscopia Raman comparada com o método bioquímico.** [s.l.] Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos. São Paulo, 2014.
- ANAGNOSTIS, P. *et al.* Menopause symptom management in women with dyslipidemias: An EMAS clinical guide. **Maturitas**, v. 135, p. 82–88, maio 2020.
- AOUDIA, N. *et al.* Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. **Food Microbiology**, v. 53, p. 51–59, fev. 2016.
- ARCE, C. M. *et al.* Kidney Function and Cardiovascular Events in Postmenopausal Women: The Impact of Race and Ethnicity in the Women’s Health Initiative. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 67, n. 2, p. 198–208, fev. 2016.
- ARUMUGAM, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 12 maio 2011.
- ASHA, M. Z.; KHALIL, S. F. H. Efficacy and Safety of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Sultan Qaboos University Medical Journal [SQUMJ]**, v. 20, n. 1, p. 13, 9 mar. 2020.
- ASSHAUER, K. P. *et al.* Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA. **Bioinformatics**, v. 31, n. 17, p. 2882–2884, 1 set. 2015.
- AURO, K. *et al.* A metabolic view on menopause and ageing. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4708, 21 dez. 2014.
- AVIS, N. E.; CRAWFORD, S. L.; GREEN, R. Vasomotor Symptoms Across the Menopause Transition. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 629–640, dez. 2018.
- BAG, S. *et al.* An Improved Method for High Quality Metagenomics DNA Extraction from Human and Environmental Samples. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26775, jul. 2016.
- BAKER, J. M.; AL-NAKKASH, L.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Estrogen–gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. **Maturitas**, v. 103, n. June, p. 45–53, set. 2017.
- BEAUFILS, M. Hypertension artérielle chez la femme ménopausée. **La Presse Médicale**, v. 35, n. 6, p. 1055–1060, jun. 2006.
- BEAUMONT, M. *et al.* Heritable components of the human fecal microbiome are associated with visceral fat. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 189, 26 dez. 2016.

- BEN ALI, S. *et al.* Menopause and Metabolic Syndrome in Tunisian Women. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- BHATTARAI, Y.; MUNIZ PEDROGO, D. A.; KASHYAP, P. C. Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 1, p. G52–G62, 1 jan. 2017.
- BIAGI, E. *et al.* Gut Microbiota and Extreme Longevity. **Current Biology**, v. 26, n. 11, p. 1480–1485, jun. 2016.
- BIELANSKI, A.; HABER, J. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 13 jun. 2012.
- BIKEL, S. *et al.* Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 390–401, 2015.
- BOLYEN, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 24 ago. 2019.
- BRASIL. **Política Nacional de atenção integral á saúde da mulher: princípios e diretrizes/** Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas - Brasília, **Ministério da Saúde**, p 82, 2004.
- BRASIL. **Manual de Atencao à Mulher no Climatério/Menopausa. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Brasília, Ministério da Saúde**, p 192, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 849, de 27 de Março de 2017. **Diário Oficial da União**, 28 Março, 2017.
- BRESSA, C. *et al.* Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171352, 10 fev. 2017.
- BRITTON, R. A. *et al.* Probiotic *L. reuteri* Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 11, p. 1822–1830, nov. 2014.
- BROTMAN, R. M. *et al.* Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. **Menopause**, v. 21, n. 5, p. 450–458, maio 2014.
- BURGER, H. *et al.* Nomenclature and endocrinology of menopause and perimenopause. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 7, n. sup1, p. S35–S43, 9 nov. 2007.
- BURGER, H. The Menopausal Transition—Endocrinology. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 5, n. 10, p. 2266–2273, out. 2008.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CARVALHO, B. M.; ABDALLA SAAD, M. J. Influence of Gut Microbiota on Subclinical Inflammation and Insulin Resistance. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–13, 2013.
- CAULEY, J. A. *et al.* Bone resorption and fracture across the menopausal transition. **Menopause**, v. 19, n. 11, p. 1200–1207, nov. 2012.

- CHAN, S.; GOMES, A.; SINGH, R. S. Is menopause still evolving? Evidence from a longitudinal study of multiethnic populations and its relevance to women's health. **BMC Women's Health**, v. 20, n. 1, p. 74, 19 dez. 2020.
- CHEN, D. *et al.* *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota. **Cancer Letters**, v. 469, p. 456–467, jan. 2020.
- CHEUNG, S. G. *et al.* Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. FEB, 11 fev. 2019.
- CHILDS, C. E. *et al.* Xylo-oligosaccharides alone or in synbiotic combination with *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis induce bifidogenesis and modulate markers of immune function in healthy adults: a double-blind, placebo-controlled, randomised, factorial cross-over study. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 11, p. 1945–1956, 14 jun. 2014.
- CHOI, Y. *et al.* Menopausal stages and serum lipid and lipoprotein abnormalities in middle-aged women. **Maturitas**, v. 80, n. 4, p. 399–405, abr. 2015.
- COSTA, M.; WEESE, J. S. Methods and basic concepts for microbiota assessment. **The Veterinary Journal**, v. 249, p. 10–15, jul. 2019.
- CRAMER, H.; PENG, W.; LAUCHE, R. Yoga for menopausal symptoms—A systematic review and meta-analysis. **Maturitas**, v. 109, n. November 2017, p. 13–25, mar. 2018.
- CROVESY, L.; MASTERSON, D.; ROSADO, E. L. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 9, p. 1251–1262, 30 set. 2020.
- DAVID, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 11 jan. 2014.
- DE JONG, M. F.; ALTO, N. M. Cooperative Immune Suppression by *Escherichia coli* and *Shigella* Effector Proteins. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 4, p. 1–10, abr. 2018.
- DONG, J.-Y.; QIN, L.-Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 2, p. 315–323, 27 jan. 2011.
- DU, X. *et al.* Probiotics, prebiotics, and synbiotics supplementation in prediabetes: protocol for a systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 99, n. 13, p. e19708, mar. 2020.
- DUGAN, S. A. *et al.* A Multimethod Investigation Into Physical Activity in Midlife Women. **Journal of Physical Activity and Health**, v. 13, n. 12, p. 1351–1359, dez. 2016.
- EGSHATYAN, L. *et al.* Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance. **Endocrine Connections**, v. 5, n. 1, p. 1–9, jan. 2016.
- EISENHARDT, S.; FLECKENSTEIN, J. Traditional Chinese medicine valuably augments therapeutic options in the treatment of climacteric syndrome. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 294, n. 1, p. 193–200, 4 jul. 2016.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1 mar. 1998.

FALUDI, A. *et al.* ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 618–619, 2017.

FAUBION, S. S.; SOOD, R.; KAPOOR, E. Genitourinary Syndrome of Menopause: Management Strategies for the Clinician. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 92, n. 12, p. 1842–1849, dez. 2017.

FEBRASGO. FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. **Manual de Orientação em Climatério**. Rio de Janeiro, 2010.

FERNANDES, J. *et al.* Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. **Nutrition & Diabetes**, v. 4, n. 6, p. e121–e121, 30 jun. 2014.

FIGUEIREDO NETO, J. A. DE *et al.* Síndrome metabólica e menopausa: estudo transversal em ambulatório de ginecologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 3, p. 339–345, set. 2010.

FLORES, R. *et al.* Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 253, 2012.

FONSECA, M. I. H. *et al.* Changes in lipoprotein subfractions following menopause in the Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Maturitas**, v. 130, n. April, p. 32–37, dez. 2019.

FOR, S. O. P.; SAMPLES, F.; EXTRACTION, D. N. A. SOP FOR FECAL SAMPLES IHMS SOP 07 V1 : STANDARD OPERATING PROTOCOL FOR FECAL SAMPLES. 2015.

FORBES, J. D. *et al.* Association of Exposure to Formula in the Hospital and Subsequent Infant Feeding Practices With Gut Microbiota and Risk of Overweight in the First Year of Life. **JAMA Pediatrics**, v. 172, n. 7, p. e181161, 2 jul. 2018.

FOUAD, M.; FATHY, H.; ZIDAN, A. Serum uric acid and its association with hypertension, early nephropathy and chronic kidney disease in type 2 diabetic patients. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 4, p. 403–410, 2016.

FREEDMAN, R. R.; KRELL, W. Reduced thermoregulatory null zone in postmenopausal women with hot flashes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 181, n. 1, p. 66–70, jul. 1999.

FREEMAN, E. W. *et al.* Duration of Menopausal Hot Flashes and Associated Risk Factors. **Obstetrics & Gynecology**, v. 117, n. 5, p. 1095–1104, maio 2011.

FU, J. *et al.* The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids. **Circulation Research**, v. 117, n. 9, p. 817–824, 9 out. 2015.

FUHRMAN, B. J. *et al.* Associations of the Fecal Microbiome With Urinary Estrogens and Estrogen Metabolites in Postmenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 12, p. 4632–4640, dez. 2014.

FUJIYOSHI, S.; MUTO-FUJITA, A.; MARUYAMA, F. Evaluation of PCR conditions for characterizing bacterial communities with full-length 16S rRNA genes using a portable nanopore sequencer. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

- GANDHI, J. *et al.* Genitourinary syndrome of menopause: an overview of clinical manifestations, pathophysiology, etiology, evaluation, and management. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 215, n. 6, p. 704–711, dez. 2016.
- GARCÍA-GOMÁRIZ, C. *et al.* Effect of 2 years of endurance and high-impact training on preventing osteoporosis in postmenopausal women: randomized clinical trial. **Menopause**, v. 25, n. 3, p. 301–306, mar. 2018.
- GASPARD, U. Hyperinsulinaemia, a key factor of the metabolic syndrome in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 62, n. 4, p. 362–365, abr. 2009.
- GOEDERT, J. J. *et al.* Investigation of the Association Between the Fecal Microbiota and Breast Cancer in Postmenopausal Women: a Population-Based Case-Control Pilot Study. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 8, p. 1–5, ago. 2015.
- GOLD, E. B. *et al.* Longitudinal Analysis of the Association Between Vasomotor Symptoms and Race/Ethnicity Across the Menopausal Transition: Study of Women’s Health Across the Nation. **American Journal of Public Health**, v. 96, n. 7, p. 1226–1235, jul. 2006.
- GOODRICH, J. K. *et al.* Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 532–535, 29 abr. 2016.
- GOUVEA, T. M. **Prevalência e fatores associados à síndrome metabólica em mulheres no climatério.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018., 2016.
- GREENE, J. Methods for Assessing Climacteric Symptoms. **British Menopause Society Journal**, v. 5, n. 4, p. 173–176, 24 dez. 1999.
- GUTHRIE, J. *et al.* The menopausal transition: a 9-year prospective population-based study. The Melbourne Women’s Midlife Health Project. **Climacteric**, v. 7, n. 4, p. 375–389, 27 dez. 2004.
- HAK, A. E.; CHOI, H. K. Menopause, postmenopausal hormone use and serum uric acid levels in US women – The Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, n. 5, p. R116, 2008.
- HANSEN, K. R. *et al.* Ovarian primordial and nongrowing follicle counts according to the Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW) staging system. **Menopause**, v. 19, n. 2, p. 164–171, fev. 2012.
- HARLOW, S. D. *et al.* Evaluation of four proposed bleeding criteria for the onset of late menopausal transition. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 91, n. 9, p. 3432–8, set. 2006.
- HARLOW, S. D. *et al.* The ReSTAGE Collaboration: defining optimal bleeding criteria for onset of early menopausal transition. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 1, p. 129–140, jan. 2008.
- HARLOW, S. D. *et al.* Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10. **Menopause**, v. 19, n. 4, p. 387–395, abr. 2012.
- HAUSER, G. A. *et al.* [Evaluation of climacteric symptoms (Menopause Rating Scale)]. **Zentralbl Gynakol**, v. 116, n. 1, p. 16–23, 1994.

- HE, L. *et al.* Menopause with cardiovascular disease and its risk factors among rural Chinese women in Beijing: A population-based study. **Maturitas**, v. 72, n. 2, p. 132–138, jun. 2012.
- HE, S.-J. *et al.* The relationship between serum uric acid and metabolic syndrome in premenopausal and postmenopausal women in the Jinchang Cohort. **Gynecological Endocrinology**, v. 33, n. 2, p. 141–144, 1 fev. 2017.
- HEINEMANN, K. *et al.* The Menopause Rating Scale (MRS) scale: A methodological review. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 2, p. 1–8, 2004.
- HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 10 ago. 2014.
- HOLESH, J. E.; BASS, A. N.; LORD, M. **Physiology, Ovulation**. In StatPearls. StatPearls Publishing. 2021.
- IBGE. Sinopse do Censo demográfico 2010. **Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, RJ.**, p. 261, 2011.
- ILLUMINA. 16S Metagenomic Sequencing Library. **Illumina.com**, n. B, p. 1–28, 2013.
- ILLUMINA. NovaSeq 6000 Sequencing System. **770-2016-025-H**, v. 4, n. February, p. 1–4, 2016.
- JAFARI-GIV, Z. *et al.* Association of body mass index with serum calcium and phosphate levels. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 2, p. 975–980, mar. 2019.
- JANSSEN, I. *et al.* Correlates of 15-Year Maintenance of Physical Activity in Middle-Aged Women. **International Journal of Behavioral Medicine**, v. 21, n. 3, p. 511–518, 29 jun. 2014.
- KAGAN, R.; KELLOGG-SPADT, S.; PARISH, S. J. Practical Treatment Considerations in the Management of Genitourinary Syndrome of Menopause. **Drugs & Aging**, v. 36, n. 10, p. 897–908, 26 out. 2019.
- KARLSSON, F. H. *et al.* Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 99–103, 29 jun. 2013.
- KATO, K. *et al.* Age-Related Changes in the Composition of Gut Bifidobacterium Species. **Current Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 987–995, 8 ago. 2017.
- KAUR, H. *et al.* Crosstalk Between Female Gonadal Hormones and Vaginal Microbiota Across Various Phases of Women’s Gynecological Lifecycle. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. March, p. 1–17, 31 mar. 2020.
- KENNY, D. J. *et al.* Cholesterol Metabolism by Uncultured Human Gut Bacteria Influences Host Cholesterol Level. **Cell Host & Microbe**, v. 28, n. 2, p. 245–257.e6, ago. 2020.
- KHAN, M. J. *et al.* Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. **Journal of Obesity**, v. 2016, p. 1–27, 2016.
- KIM, H.-K. *et al.* The Recent Review of the Genitourinary Syndrome of Menopause. **Journal of Menopausal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 65, 2015.

- KIM, H. M. *et al.* The Effect of Menopause on the Metabolic Syndrome Among Korean Women: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey, 2001. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 701–706, 1 mar. 2007.
- KIM, M.; YU, Z. Variations in 16S rRNA-based microbiome profiling between pyrosequencing runs and between pyrosequencing facilities. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 355–365, 11 maio 2014.
- KINGSBERG, S. A. *et al.* Vulvar and Vaginal Atrophy in Postmenopausal Women: Findings from the REVIVE (REal Women's VIEWS of Treatment Options for Menopausal Vaginal ChangEs) Survey. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 10, n. 7, p. 1790–1799, jul. 2013.
- KLINDWORTH, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. e1–e1, 1 jan. 2013.
- KNIGHT, R. *et al.* Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 410–422, 23 jul. 2018.
- KONG, F. *et al.* Gut microbiota signatures of longevity. **Current Biology**, v. 26, n. 18, p. R832–R833, set. 2016.
- KOOK, S. Y. *et al.* Characterization of the fecal microbiota differs between age groups in Koreans. **Intestinal Research**, v. 16, n. 2, p. 246–254, 2018.
- KRISS, M. *et al.* Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. **Current Opinion in Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 34–40, ago. 2018.
- KUPPERMAN, H. S. *et al.* Comparative clinical evaluation of estrogenic preparations by the menopausal and amenorrheal indices. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 13, n. 6, p. 688–703, jun. 1953.
- KWA, M. *et al.* The Intestinal Microbiome and Estrogen Receptor–Positive Female Breast Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 8, p. 1–10, 22 abr. 2016.
- KWOK, L. *et al.* Characterization of Fecal Microbiota across Seven Chinese Ethnic Groups by Quantitative Polymerase Chain Reaction. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93631, 3 abr. 2014.
- LAGIER, J.-C. *et al.* The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics To Study Human Gut Microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 237–264, 7 jan. 2015.
- LANGILLE, M. G. I. *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814–821, 25 set. 2013.
- LEBLANC, J. G. *et al.* Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, abr. 2013.
- LEE, S. M. *et al.* The intestinal microbiota as a predictor for antidepressant treatment outcome in geriatric depression: a prospective pilot study. **International Psychogeriatrics**, p. 1–13, 24 mar. 2021.
- LEY, R. E. *et al.* Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, 21 dez. 2006.

- LEY, R. E. Prevotella in the gut: choose carefully. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 2, p. 69–70, 1 fev. 2016.
- LI, C. et al. Gut microbiota composition and bone mineral loss—epidemiologic evidence from individuals in Wuhan, China. **Osteoporosis International**, v. 30, n. 5, p. 1003–1013, 21 maio 2019.
- LI, J. *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 834–841, 6 ago. 2014.
- LI, J. *et al.* Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 14, 1 dez. 2017.
- LI, L.; WANG, Z. Ovarian Aging and Osteoporosis. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1086p. 199–215. 2018
- LI, Q. *et al.* The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. April, 28 abr. 2017.
- LIU, R. *et al.* Dysbiosis of Gut Microbiota Associated with Clinical Parameters in Polycystic Ovary Syndrome. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–12, 28 fev. 2017.
- LOBO, R. A. *et al.* Prevention of diseases after menopause. **Climacteric**, v. 17, n. 5, p. 540–556, 27 out. 2014.
- LONG, S. L.; GAHAN, C. G. M.; JOYCE, S. A. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 56, p. 54–65, ago. 2017.
- LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 661–672, 8 out. 2014.
- LUI FILHO, J. F. *et al.* Epidemiologia da menopausa e dos sintomas climatéricos em mulheres de uma região metropolitana no sudeste do Brasil: inquérito populacional domiciliar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 4, p. 152–158, abr. 2015.
- MACHIELS, K. *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. **Gut**, v. 63, n. 8, p. 1275–1283, ago. 2014.
- MAKI, P. M.; HENDERSON, V. W. Cognition and the menopause transition. **Menopause**, v. 23, n. 7, p. 803–805, jul. 2016.
- MARASCO, G. *et al.* Gut Microbiota and Celiac Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 6, p. 1461–1472, 2 jun. 2016.
- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 31, 30 dez. 2015.
- MARKLE, J. G. M. *et al.* Sex Differences in the Gut Microbiome Drive Hormone-Dependent Regulation of Autoimmunity. **Science**, v. 339, n. 6123, p. 1084–1088, 1 mar. 2013.
- MARKOWIAK, P.; ŚLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 15 set. 2017.
- MARKOWITZ, V. M. *et al.* IMG: the integrated microbial genomes database and comparative

- analysis system. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D115–D122, 1 jan. 2012.
- MARLATT, K. L.; BEYL, R. A.; REDMAN, L. M. A qualitative assessment of health behaviors and experiences during menopause: A cross-sectional, observational study. **Maturitas**, v. 116, n. 1, p. 36–42, out. 2018.
- MARTIN, C. R. *et al.* The Brain-Gut-Microbiome Axis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 133–148, 2018.
- MCINTOSH, F. M. *et al.* Phylogenetic distribution of genes encoding β -glucuronidase activity in human colonic bacteria and the impact of diet on faecal glycosidase activities. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1876–1887, ago. 2012.
- MEIRELLES, R. M. R. Menopausa e síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 91–96, mar. 2014.
- MILLER, L. M. *et al.* Being overweight or obese is associated with harboring a gut microbial community not capable of metabolizing the soy isoflavone daidzein to O-desmethylangolensin in peri- and post-menopausal women. **Maturitas**, v. 99, p. 37–42, maio 2017.
- MILLS, S. *et al.* Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 923, 24 abr. 2019.
- MORAL, E. *et al.* The impact of genitourinary syndrome of menopause on well-being, functioning, and quality of life in postmenopausal women. **Menopause**, v. 25, n. 12, p. 1418–1423, dez. 2018.
- MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, p. e1002808, 27 dez. 2012.
- MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 3 maio 2016.
- MOUZAKI, M. *et al.* Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 58, n. 1, p. 120–127, jul. 2013.
- MUHLEISEN, A. L.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Menopause and the vaginal microbiome. **Maturitas**, v. 91, p. 42–50, set. 2016.
- NAPOLI, N. *et al.* Effects of dietary calcium compared with calcium supplements on estrogen metabolism and bone mineral density. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1428–1433, 1 maio 2007.
- NAPPI, R. E.; KOKOT-KIEREPA, M. Women’s voices in the menopause: Results from an international survey on vaginal atrophy. **Maturitas**, v. 67, n. 3, p. 233–238, nov. 2010.
- NAPPI, R. E.; KOKOT-KIEREPA, M. Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes (VIVA) – results from an international survey. **Climacteric**, v. 15, n. 1, p. 36–44, 14 fev. 2012.
- NAPPI, R. E.; PALACIOS, S. Impact of vulvovaginal atrophy on sexual health and quality of life at postmenopause. **Climacteric**, v. 17, n. 1, p. 3–9, 15 fev. 2014.
- NARVA, M. *et al.* The effect of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on acute changes in calcium metabolism in postmenopausal women. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 61–68, 1 abr. 2004.

- O'CALLAGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. *Bifidobacteria* and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 15 jun. 2016.
- O'CONNOR, K. A.; HOLMAN, D. J.; WOOD, J. W. Menstrual cycle variability and the perimenopause. **American Journal of Human Biology**, v. 13, n. 4, p. 465–478, jul. 2001.
- O'NEILL, S.; EDEN, J. The pathophysiology of menopausal symptoms. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 22, n. 3, p. 63–69, mar. 2012.
- ODAMAKI, T. *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 90, 25 dez. 2016.
- OLIVEIRA, J. *et al.* Padrão hormonal feminino : menopausa e terapia de reposição Female hormone pattern : menopause and replacement therapy. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 3, p. 198–210, 2016.
- ORTIGÃO, R. *et al.* Gastrointestinal Microbiome – What We Need to Know in Clinical Practice. **GE - Portuguese Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 5, p. 336–351, 2020.
- OZAKI, D. *et al.* Association between gut microbiota, bone metabolism, and fracture risk in postmenopausal Japanese women. **Osteoporosis International**, v. 32, n. 1, p. 145–156, 25 jan. 2021.
- OZATO, N. *et al.* Blautia genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 28, 4 dez. 2019.
- PARDHE, B. D. *et al.* Elevated Cardiovascular Risks among Postmenopausal Women: A Community Based Case Control Study from Nepal. **Biochemistry Research International**, v. 2017, n. Cvd, p. 1–5, 2017.
- PARDINI, D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 172–181, mar. 2014.
- PARK, M.; CHOI, J.; LEE, H.-J. Flavonoid-Rich Orange Juice Intake and Altered Gut Microbiome in Young Adults with Depressive Symptom: A Randomized Controlled Study. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1815, 18 jun. 2020.
- PARKS, D. H. *et al.* STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 1 nov. 2014.
- PAYNE, A. N. *et al.* The composition and metabolic activity of child gut microbiota demonstrate differential adaptation to varied nutrient loads in an in vitro model of colonic fermentation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 608–623, jun. 2012.
- PENDERS, J. *et al.* Quantification of *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 1, p. 141–147, fev. 2005.
- PINKERTON, J. A. V. *et al.* The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 25, n. 11, p. 1362–1387, nov. 2018.
- PLOTTEL, C. S.; BLASER, M. J. Microbiome and Malignancy. **Cell Host & Microbe**, v. 10, n. 4, p. 324–335, out. 2011.
- POTTHOFF, P. *et al.* Menopause-Rating-Skala (MRS II): Methodische Standardisierung in der

deutschen Bevölkerung [The Menopause Rating Scale (MRS II): methodological standardization in the German population]. **Zentralbl Gynakol.**, p. 122(5):280–6, 2000.

PU, D. *et al.* Metabolic syndrome in menopause and associated factors: a meta-analysis. **Climacteric**, v. 20, n. 6, p. 583–591, 2 nov. 2017.

QIN, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 55–60, 26 out. 2012.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012.

RADOMINSKI, S. C. *et al.* Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. S 2, p. 452–466, 2017.

RANDOLPH, J. F. *et al.* Change in Follicle-Stimulating Hormone and Estradiol Across the Menopausal Transition: Effect of Age at the Final Menstrual Period. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 3, p. 746–754, 1 mar. 2011.

RAZAVI, A. C. *et al.* Sex, gut microbiome, and cardiovascular disease risk. **Biology of Sex Differences**, v. 10, n. 1, p. 29, 10 dez. 2019.

RETTEDAL, E. A. *et al.* The Gut Microbiome Is Altered in Postmenopausal Women With Osteoporosis and Osteopenia. **JBMR Plus**, v. 5, n. 3, p. 1–9, 19 mar. 2021.

RIETJENS, I. M. C. M.; LOUISSE, J.; BEEKMANN, K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1263–1280, jun. 2017.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 10 jan. 2019.

RINTTILA, T. *et al.* Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1166–1177, dez. 2004.

RITCHIE, M. L.; ROMANUK, T. N. A Meta-Analysis of Probiotic Efficacy for Gastrointestinal Diseases. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34938, 18 abr. 2012.

RIVIÈRE, A. *et al.* *Bifidobacteria* and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 28 jun. 2016.

ROBBINS, J. A. *et al.* Women's Health Initiative clinical trials. **Menopause**, v. 21, n. 2, p. 116–123, fev. 2014.

RODRÍGUEZ, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 0, p. 1–17, 2 fev. 2015.

ROLHION, N.; CHASSAING, B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1707, p. 20150504, 5 nov. 2016.

- ROUDEBUSH, W. E.; KIVENS, W. J.; MATTKE, J. M. Biomarkers of Ovarian Reserve. **Biomarker insights**, v. 3, n. 1, p. 259–268, 16 abr. 2008.
- SAMARKOS, M.; MASTROGIANNI, E.; KAMPOUROPOULOU, O. The role of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection. **European Journal of Internal Medicine**, v. 50, n. December 2017, p. 28–32, abr. 2018.
- SAMBROOK, JOSEPH & MANIATIS, T. & F. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed., **E. F & Cold Spring Harbor Laboratory**, v. 2 ed, 1987.
- SANTORO, N.; EPPERSON, C. N.; MATHEWS, S. B. Menopausal Symptoms and Their Management. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 44, n. 3, p. 497–515, set. 2015.
- SANTOS-MARCOS, J. A. *et al.* Influence of gender and menopausal status on gut microbiota. **Maturitas**, v. 116, n. April, p. 43–53, out. 2018.
- SANTOS, R. M. **Associação entre depressão e a intensidade dos sintomas climatéricos na pós-menopausa.** [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Fernandes Figueira, 2014.
- SANTOS, V. M. **Avaliação da participação dos mircro-organismos da classe Mollicutes na microbiota intestinal de mulheres eutróficas e obesas.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 15 mar. 2016.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L. Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3219–3226, 15 maio 2011.
- SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863–864, 15 mar. 2011.
- SCHNORR, S. L. *et al.* Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 3654, 15 maio 2014.
- SELGRADE, J. F.; HARRIS, L. A.; PASTEUR, R. D. A model for hormonal control of the menstrual cycle: Structural consistency but sensitivity with regard to data. **Journal of Theoretical Biology**, v. 260, n. 4, p. 572–580, 2009.
- SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 337–340, jan. 2016.
- SERPA, M. A. *et al.* Fatores associados à qualidade de vida em mulheres no climatério. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 2, p. 76–81, maio 2016.
- SHUSTER, L. T. *et al.* Premature menopause or early menopause: Long-term health consequences. **Maturitas**, v. 65, n. 2, p. 161–166, 2010.
- SJÖGREN, K. *et al.* The gut microbiota regulates bone mass in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 6, p. 1357–1367, 17 jun. 2012.
- SLEVIN, M. M. *et al.* Supplementation with Calcium and Short-Chain Fructo-Oligosaccharides Affects Markers of Bone Turnover but Not Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 3, p. 297–304, 1 mar. 2014.
- SOBRAC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CLIMATÉRIO - **Guia da Menopausa.**

Sociedade Norte americana de menopausa - NAMS - 7ª Edição, 2013.

SOULES, M. R. *et al.* Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). **Climacteric**, v. 4, n. 4, p. 267–272, 3 jan. 2001.

ŠTŠEPETOVA, J. *et al.* Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 8, p. 1235–1244, 28 abr. 2011.

SUNDIN, J. *et al.* Altered faecal and mucosal microbial composition in post-infectious irritable bowel syndrome patients correlates with mucosal lymphocyte phenotypes and psychological distress. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, n. 4, p. 342–351, fev. 2015.

THAISS, C. A. *et al.* Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. **Cell**, v. 159, n. 3, p. 514–529, out. 2014.

THE LANCET ONCOLOGY. COVID-19: global consequences for oncology. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 4, p. 467, abr. 2020.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, dez. 2006.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* The Human Microbiome Project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804–810, 17 out. 2007.

TURNBAUGH, P. J.; GORDON, J. I. The core gut microbiome, energy balance and obesity. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 17, p. 4153–4158, 1 set. 2009.

UTIAN, W. H. The International Menopause menopause-related terminology definitions. **Climacteric**, v. 2, n. 4, p. 284–286, 3 jan. 1999.

UTIAN, W. H. Menopause-related definitions. **International Congress Series**, v. 1266, n. C, p. 133–138, abr. 2004.

VALLES-COLOMER, M. *et al.* The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 623–632, 4 abr. 2019.

VAN DIJK, E. L. *et al.* Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 9, p. 418–426, set. 2014.

VAN HUL, M. *et al.* From correlation to causality: the case of Subdoligranulum. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1849998, 9 nov. 2020.

VITORINO, L. M. *et al.* Factors associated with mental health and quality of life during the COVID-19 pandemic in Brazil. **BJPsych Open**, v. 7, n. 3, p. e103, 14 maio 2021.

VOGT, N. M. *et al.* Gut microbiome alterations in Alzheimer’s disease. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13537, 19 dez. 2017.

WAN, Y. *et al.* Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. **Gut**, v. 68, n. 8, p. 1417–1429, ago. 2019.

WANG, Q. *et al.* Metabolic characterization of menopause: cross-sectional and longitudinal evidence. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, p. 17, 6 dez. 2018.

- WANG, Z. *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 57–63, 6 abr. 2011.
- WHO. WORD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. [s.l.: s.n.]. v. 8
- WHO. Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 866, p. 1-107, 1996.
- WILCK, N. *et al.* Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. **Nature**, v. 551, n. 7682, p. 585–589, 15 nov. 2017.
- WLODARSKA, M.; KOSTIC, A. D.; XAVIER, R. J. An Integrative View of Microbiome-Host Interactions in Inflammatory Bowel Diseases. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 5, p. 577–591, maio 2015.
- WU, J. *et al.* Association between premature ovarian insufficiency and gut microbiota. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 21, n. 1, p. 418, 5 dez. 2021.
- XIE, Y.-H. *et al.* Fecal *Clostridium* symbiosum for Noninvasive Detection of Early and Advanced Colorectal Cancer: Test and Validation Studies. **EBioMedicine**, v. 25, p. 32–40, nov. 2017.
- XU, X. *et al.* Intestinal microbiota: a potential target for the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Bone Research**, v. 5, n. 1, p. 17046, 4 dez. 2017.
- YANG, L.-C. *et al.* The prebiotic effect of *Anoectochilus formosanus* and its consequences on bone health. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 10, p. 1779–1788, 28 maio 2013.
- YANG, T. *et al.* Gut Dysbiosis Is Linked to Hypertension. **Hypertension**, v. 65, n. 6, p. 1331–1340, jun. 2015.
- YANG, Y.-L. *et al.* Intestinal flora is a key factor in insulin resistance and contributes to the development of polycystic ovary syndrome. **Endocrinology**, p. 1–29, 19 jun. 2021.
- YASSOUR, M. *et al.* Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 343, p. 343ra81-343ra81, 15 jun. 2016.
- ZHANG, S. X. *et al.* Early evidence and predictors of mental distress of adults one month in the COVID-19 epidemic in Brazil. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 142, n. January, p. 110366, mar. 2021.
- ZHANG, Y. *et al.* A cross-cultural comparison of climacteric symptoms, self-esteem, and perceived social support between Mosuo women and Han Chinese women. **Menopause**, v. 23, n. 7, p. 784–791, jul. 2016.
- ZHU, D. *et al.* Age at natural menopause and risk of incident cardiovascular disease: a pooled analysis of individual patient data. **The Lancet Public Health**, v. 4, n. 11, p. e553–e564, 2019.

11 ANEXOS

11.1 ANEXO A: APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/UFOP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da correlação da microbiota intestinal e vaginal no desenvolvimento de doenças em mulheres no climatério.

Pesquisador: RENATA GUERRA DE SA COTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 29723420.9.0000.5150

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.957.304

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1511637.pdf de 04/03/2020) e do Projeto Detalhado.

Os seres humanos e sua microbiota integram relações genéticas e metabólicas as quais auxiliam na sua adaptação ao meio. A grande maioria desses microorganismos no corpo humano é encontrada no intestino, e distribuída em mais de 500 espécies que auxiliam em diversos processos fisiológicos. A mudança nos hormônios sexuais femininos, em destaque a redução ou ausência do estrogênio, leva à uma modulação da microbiota podendo alterá-la causando uma disbiose intestinal. Esse desequilíbrio é provocado pela diminuição de bactérias boas do intestino, ocasionando alterações no estroboloma, um agregado de microorganismos capazes de metabolizar o estrogênio influenciando nos processos fisiológicos dependentes do mesmo, podendo acarretar o surgimento de doenças crônicas como obesidade, doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes. Diante desse contexto de alterações hormonais que desencadeiam modificações no metabolismo do estrogênio podendo deflagrar doenças crônicas, esse estuda visa caracterizar a microbiota intestinal e vaginal de mulheres no climatério, e correlacionar com o

Continuação do Parecer: 3.957.304

9. Os documentos submetidos ao Sistema CEP/Conep que necessitam de assinatura dos responsáveis devem ser encaminhados, preferencialmente, com certificação digital ou por documento digitalizado. Será aceita, em caráter excepcional, a dispensa das assinaturas nos documentos necessários para a submissão dos protocolos de pesquisa, durante o período em que estiverem instaladas as medidas de segurança para a saúde pública. A devida retificação deverá ser submetida ao sistema CEP/CONEP, assim que possível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o CEP/UFOP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFOP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e/ou Res. CNS 510/16, manifesta-se pela APROVAÇÃO deste protocolo de pesquisa. Ressalta-se ao pesquisador responsável pelo projeto o compromisso de envio ao CEP/UFOP, um ano após o início do projeto, do relatório final ou parcial de sua pesquisa, encaminhado por meio da Plataforma Brasil, informando, em qualquer tempo, o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1511637.pdf	06/04/2020 14:43:52		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoFinalDois.docx	04/03/2020 16:06:57	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
Declaração do Patrocinador	DeclaragastosProjetoCEPUFOP.pdf	04/03/2020 15:59:08	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
Orçamento	OrcdoProjetoCEPok.docx	04/03/2020 15:57:59	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
Cronograma	CronogramadoProjetoCEP.pdf	04/03/2020 15:57:37	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostook.pdf	04/03/2020 15:54:31	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.docx	18/02/2020 16:10:43	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito

Continuação do Parecer: 3.957.304

Ausência	TCLE.docx	18/02/2020 16:10:43	RENATA GUERRA DE SA COTA	Aceito
----------	-----------	------------------------	--------------------------	--------

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

OURO PRETO, 06 de Abril de 2020

11.2 ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO – TCLE

Você está sendo convidada a participar da pesquisa **“Influência da correlação da microbiota intestinal e vaginal no desenvolvimento de doenças em mulheres no climatério”**, de responsabilidade das pesquisadoras: Prof.^a. Dra. Renata Guerra Sá e das Mestrandas Thayane Christine Alves da Silva, Jennefer Aparecida Gonçalves Oliveira inscritas no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas e Biotecnologia na Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP. Durante o período do climatério, as mudanças hormonais podem influenciar a microbiota intestinal e vaginal, podendo levar a um desequilíbrio desses microrganismos presentes nessas regiões e desencadear doenças crônicas. É necessário então caracterizar e conhecer essa microbiota, com o intuito de correlacionar as bactérias ali presentes com o desenvolvimento de doenças como hipertensão arterial, diabetes mellitus, e síndrome metabólica durante o período do climatério. Essa pesquisa será realizada com um grupo de mulheres na faixa etária de 40 á 65 anos, que estejam no climatério e apresentem pelo menos uma das seguintes queixas: secura vaginal, dor/ardor, secreção vaginal, desconforto ao urinar, urgência para ir ao banheiro urinar ou incontinência urinária. Não participarão da pesquisa mulheres que apresentarem alguma neoplasia maligna, sangramento genital anormal de causa desconhecida após a menopausa, tromboembolismo, alterações atuais na citologia oncótica cervicovaginal de Papanicolau. O estudo será realizado através dos seguintes procedimentos: Entrevista com a convidada, coleta de amostras de sangue, coleta de amostras de fezes e coleta de swab vaginal da participante. Serão coletados 10 mL de amostras de sangue, por profissional habilitado para exercer tal função, e posteriormente serão analisados alguns componentes como índices glicêmicos, lipídicos e hormonais. Durante os procedimentos descritos acima, você ficará em uma sala reservada, visando resguardar sua privacidade e reduzir a chance de qualquer tipo de constrangimento. Será realizada primeiramente a coleta de sangue e em seguida a coleta do swab vaginal, ambas serão realizadas por um profissional capacitado e habilitado para a função. No ato da entrega desse termo será entregue também um kit para coleta das fezes contendo: um recipiente estéril para coleta, luvas e espátula coletora. Essa coleta será realizada na residência da participante e deverá ser entregue na Unidade Básica de Saúde. Posteriormente a equipe de pesquisa ficará responsável por buscar o recipiente com a amostra fecal na UBS. A amostra deverá ser armazenada no refrigerador e entregue em até um dia após a coleta. A entrevista contará com três questionários destinados as participantes, sendo um questionário socioeconômico, um questionário sobre a Escala de Classificação da Menopausa (MRS), e outro questionário sobre Qualidade de Vida Relacionada à Saúde (QVRS). Os riscos com essa pesquisa são mínimos, sendo que a senhora pode se sentir desconfortável durante o procedimento de coleta de sangue, podendo ocorrer hematomas, dor e desconforto no local da punção, porém a coleta de sangue será realizada por um profissional treinado que utilizará métodos amplamente utilizados na rotina laboratorial visando minimizar esses riscos. Você tem a liberdade de não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, mesmo após o início da entrevista/coleta de dados, sem qualquer prejuízo. Os resultados serão utilizados apenas para os fins da pesquisa e para publicações científicas posteriores, sendo que nenhum voluntário será identificado e seus dados pessoais serão mantidos em sigilo total. Você não terá nenhuma despesa e não há compensação financeira relacionada à sua participação na pesquisa. Caso tenha alguma dúvida sobre a pesquisa você poderá entrar em contato com a coordenadora do projeto, Prof.^a. Dra. Renata Guerra de Sá-Cota de segunda a sexta-feira, das 08:00h às 11:00h e de 13:00h às 17:00h, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular

situado no Instituto de Ciências exatas e Biológicas, setor II sala 45, no campus universitário, ou com as mestrandas responsáveis: Thayane Christine Alves da Silva e Jennefer Aparecida Gonçalves Oliveira. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto no Campus Universitário, Morro do Cruzeiro, ICEB II, sala 29, pelos telefones (31) 3559-1368 ou pelo e-mail propp@ufop.br.

Este termo será assinado em duas vias, pela senhora e pelo pesquisador, ficando uma via em seu poder e a outra será arquivada na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Protocolo de aceite

Eu, _____, portador do RG _____, nascido (a) em ____/____/_____, residente no endereço _____, na cidade de _____, Estado _____, podendo ser contatado (a) pelo número telefônico () _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo “**Influência da correlação da microbiota intestinal e vaginal no desenvolvimento de doenças em mulheres no climatério.**” de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Concordo que os materiais e as informações obtidas relacionadas à minha pessoa poderão ser utilizados em atividades de natureza acadêmico-científica, desde que assegurada a preservação de minha identidade. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar, se assim o desejar, de modo que declaro que concordo em participar desse estudo e recebi uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Ouro Preto, _____ de _____ de 20_____.

Assinatura do participante

Prof^a. Dr^a Renata Guerra de Sá-Cota

Thayane Christine Alves da Silva

Mestranda

Jennefer Aparecida Gonçalves Oliveira

Mestranda

11.3 ANEXO C: FICHA CLÍNICA CLIMATÉRIO

FICHA CLÍNICA DE CLIMATÉRIO

Identificação: QV _____ Data: _____ / _____ / _____ PSF/UBS: _____

Nome: _____ Profissão: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ UF: _____ Telefone: _____

Data de nascimento: _____ / _____ / _____ Idade: _____ () 40-44 () 45-49 () 50-54 () 55-60 () 61-65

Escolaridade () Nenhuma () 1º Grau () 2º Grau () Superior

Estado Civil () Sem companheiro () Com companheiro

Número de filhos: _____

Sistema de Saúde: () Público () Particular () Ambos

Renda da mulher: () <1 salário () 1 salário () 1-2 salários () 3-5 salários () >5 salários () NR

Renda Familiar: () <1 salário () 1 salário () 1-2 salários () 3-5 salários () >5 salários () NR

Antecedentes Pessoais

Hipertensão () N () S Nefropatia () N () S Tabagismo () N () S

Diabetes () N () S Hepatopatia () N () S Etilismo () N () S

Osteoporose () N () S Gastrite/Colecist () N () S Atividade física reg () N () S

Tireoidopatia () N () S Trombose () N () S Qual? _____

Frequencia? _____

Câncer () N () S Qual? _____

Cirurgia () N () S Qual? _____

Cárdio-cerebrovascular () N () S Qual? _____

Neuro-psiquiátrico () N () S Qual? _____

Medicamentos () N () S Qual? _____

Internação (últ. ano) () N () S Por quê? _____

Antecedentes Familiares (pai, mãe e/ou irmãos)

Câncer de mama () N () S Câncer ovário () N () S Osteoporose () N () S

Câncer colo do útero () N () S Câncer de cólon () N () S Córdio-cerebrovascular () N () S

Outros? _____

Antecedentes Tocoginecológicos

Idade da Menarca: _____ Ciclos regulares () N () S DUM _____ / _____ (mês/ano)

Atividade Sexual () N () S Idade da menopausa: _____ Tempo de Menopausa: _____

Tipo de Menopausa

Natural () N () S Cirúrgica () N () S Quimioterápica () N () S

Radioterápica () N () S Histerectomia () N () S Ooforectomia () N () S

Uso prévio de hormônios

Pílula () N () S Qual? _____ Tempo de uso: _____

TH () N () S Qual? _____ Dose: _____ Tempo de uso: _____

Você faz (ou já fez) uso de algum tipo de chá ou outro tratamento/alimento para diminuir os sintomas da menopausa?

() N () S () NR

Qual(is)? _____

Nome	Parte usada	Utilidade	Forma de uso e preparo	Local coleta	No. da amostra	Há quanto tempo usa?	Com quem aprendeu?	Resultados positivos?

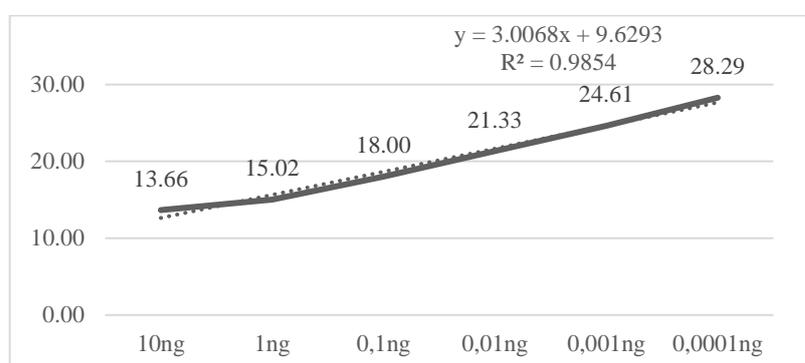
11.4 ANEXO D: MENOPAUSE RATING SCALE (MRS)

Menopause Rating Scale (MRS)

Qual dos seguintes sintômas e em que medida você diria que sente atualmente?						
Symptoms:	nenhum		pouco severo moderado		muito severo	
	-----		-----		-----	
Score =	0	1	2	3	4	
1. Falta de ar, suores, calores.....	<input type="checkbox"/>					
2. Mal estar do coração (batidas do coração diferentes, saltos nas batidas, batidas mais longas, pressão).....	<input type="checkbox"/>					
3. Problemas de sono (dificuldade em consiliar o sono, em dormir toda a noite e despertar-se cedo).....	<input type="checkbox"/>					
4. Estado de animo depressivo (sentir-se decaída, triste, a ponto das lágrimas, falta de vontade, trocas de humor).....	<input type="checkbox"/>					
5. Irritabilidade (sentir-se nervosa, tensa, agressiva).....	<input type="checkbox"/>					
6. Ansiedade (impaciência, panico).....	<input type="checkbox"/>					
7. Esgotamento físico e mental (caída geral em seu desempenho, falta de concentração, falta de memória).....	<input type="checkbox"/>					
8. Problemas sexuais (falta no desejo sexual, na atividade e satisfação).....	<input type="checkbox"/>					
9. Problemas de bexiga (dificuldade de urinar, incontinência, desejo excessivo de urinar).....	<input type="checkbox"/>					
10. Ressecamento vaginal (sensação de ressecamento, ardência e problemas durante a relação sexual).....	<input type="checkbox"/>					
11. Problemas musculares e nas articulações (dores reumaticas e nas articulações)						

11.5 ANEXO E : Curva Padrão utilizando *Primer 16S rRNA* para quantificar cópias de DNA bacteriano.

Amostra (Diluições)	CTs média Triplicata	Média CT	DNA(g/ML)	Constante	pb E coli	(g/mol)	N° DE CÓPIAS (moléculas/μl)
M01 10ng	13.66	13.66	1.00E-08	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.98E+13
M03 10ng	14.03		1.00E-08	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M04 10ng	13.70		1.00E-08	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M01 1ng	15.02	15.02	1.00E-09	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.98E+12
M03 1ng	15.50		1.00E-09	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M04 1ng	15.26		1.00E-09	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M01 0,1ng	18.00	18.00	1.00E-10	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.98E+11
M03 0,1ng	18.47		1.00E-10	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M04 0,1ng	17.91		1.00E-10	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M01 0,01ng	21.33	21.33	1.00E-11	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.98E+10
M03 0,01ng	21.46		1.00E-11	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M04 0,01ng	21.23		1.00E-11	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M01 0,001ng	24.61	24.61	1.00E-12	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.98E+09
M03 0,001ng	25.13		1.00E-12	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M04 0,001ng	25.05		1.00E-12	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M01 0,0001ng	28.29	28.29	1.00E-13	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.98E+08
M03 0,0001ng	28.56		1.00E-13	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	
M04 0,0001ng	27.79		1.00E-13	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	



Núm. cópias= [DNA (g/μL) x 6'022*10²³ (pb/mol)] / [lenght (pb) x 660(g/mol)]

Onde a fórmula representa:

- DNA(g/μL) Concentração de DNA utilizado (10ng/ 1ng/ 0,1ng/ 0,001ng/ 0,0001ng/)
- Constante: 6'022*10²³
- Lenght: 4,600.00pb (DNA E.coli)
- Constante: 660 (g/mol)

11.6 ANEXO F: Número de cópias de DNA bacteriano quantificado por qPCR utilizando *Primer* 16S rRNA para os gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*.

Amostra	Primer	Média Ct	qtde Dna (ng)	qtde Dna/qtde mg fezes	Constante	pb <i>E. coli</i>	(g/mol)	Cópias de DNA	N° total Bactérias
M01	16s - Universal	13.61							1.50E+21
M01	<i>Bifidobacterium</i>	20.07	9.41E-03	6.27E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+18	
M01	<i>Bacteroides</i>	16.90	9.39E-01	6.26E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+20	
M01	<i>Lactobacillus</i>	24.76	1.01E-03	6.71E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+17	
M01	<i>Clostridium</i>	14.13	1.03E+01	6.90E-01	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+21	
M03	16s - Universal	13.39							2.52E+20
M03	<i>Lactobacillus</i>	27.90	9.86E-05	6.58E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+16	
M03	16s - Universal	13.78							
M03	<i>Bifidobacterium</i>	25.90	1.05E-03	7.02E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+17	
M03	<i>Bacteroides</i>	14.34	9.55E-01	6.36E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	
M03	<i>Clostridium</i>	14.36	9.56E-01	6.38E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	
M04	16s - Universal	13.64							2.55E+20
M04	<i>Bifidobacterium</i>	19.09	1.06E-01	7.07E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+19	
M04	<i>Bacteroides</i>	14.78	9.84E-01	6.56E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+20	
M04	<i>Lactobacillus</i>	23.89	9.71E-04	6.47E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+17	
M04	<i>Clostridium</i>	15.04	8.36E-01	5.57E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.11E+20	
M05	16s - Universal	14.48							2.83E+20
M05	<i>Bifidobacterium</i>	16.64	1.11E+00	7.39E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.47E+20	
M05	<i>Bacteroides</i>	21.56	1.01E-02	6.74E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+18	
M05	<i>Lactobacillus</i>	26.66	9.42E-05	6.28E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.25E+16	
M05	<i>Clostridium</i>	15.38	1.02E+00	6.82E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+20	
M06	16s - Universal	13.47							2.94E+20

M06	<i>Bifidobacterium</i>	19.57	1.09E-01	7.25E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.44E+19	
M06	<i>Bacteroides</i>	16.12	1.07E+00	7.16E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.42E+20	
M06	<i>Lactobacillus</i>	19.28	1.07E-01	7.14E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.42E+19	
M06	<i>Clostridium</i>	14.00	9.32E-01	6.21E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.23E+20	
M07	16s - Universal	14.10							2.83E+20
M07	<i>Bifidobacterium</i>	19.72	1.10E-01	7.30E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.45E+19	
M07	<i>Bacteroides</i>	15.38	1.02E+00	6.82E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+20	
M07	<i>Lactobacillus</i>	26.98	9.54E-05	6.36E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+16	
M07	<i>Clostridium</i>	15.16	1.01E+00	6.73E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+20	
M08	16s - Universal	13.72							4.07E+20
M08	<i>Bifidobacterium</i>	15.42	1.03E+00	6.85E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+20	
M08	<i>Bacteroides</i>	16.58	1.10E+00	7.36E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.46E+20	
M08	<i>Lactobacillus</i>	22.26	1.04E-02	6.96E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+18	
M08	<i>Clostridium</i>	14.11	9.39E-01	6.26E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+20	
M09	16s - Universal	13.63							2.96E+20
M09	<i>Bifidobacterium</i>	17.95	9.97E-02	6.65E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+19	
M09	<i>Bacteroides</i>	16.23	1.08E+00	7.20E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+20	
M09	<i>Lactobacillus</i>	18.43	1.02E-01	6.83E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+19	
M09	<i>Clostridium</i>	14.30	9.52E-01	6.35E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	
M10	16s - Universal	14.61							1.57E+20
M10	<i>Bacteroides</i>	16.44	1.09E-01	7.30E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.45E+19	
M10	<i>Bifidobacterium</i>	19.38	1.08E-01	7.18E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.42E+19	
M10	<i>Lactobacillus</i>	26.21	1.07E-03	7.10E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+17	
M10	<i>Clostridium</i>	14.54	9.68E-01	6.46E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	
M11	16s - Universal	14.11							4.08E+20
M11	<i>Bifidobacterium</i>	16.14	1.07E+00	7.17E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.42E+20	
M11	<i>Bacteroides</i>	14.95	9.95E-01	6.64E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+20	

M11	<i>Lactobacillus</i>	24.34	9.89E-04	6.59E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+17	
M11	<i>Clostridium</i>	15.21	1.01E+00	6.75E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+20	
M12	16s - Universal	14.12							1.41E+20
M12	<i>Bifidobacterium</i>	17.87	9.93E-02	6.62E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+19	
M12	<i>Bacteroides</i>	20.46	1.14E-02	7.58E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.50E+18	
M12	<i>Lactobacillus</i>	24.92	1.01E-03	6.75E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+17	
M12	<i>Clostridium</i>	14.36	9.56E-01	6.38E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	
M13	16s - Universal	13.95							
M13	<i>Bifidobacterium</i>	19.59	1.09E-01	7.26E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.44E+19	
M13	<i>Bacteroides</i>	16.01	1.07E+00	7.11E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+20	
M13	<i>Lactobacillus</i>	25.91	1.05E-03	7.02E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+17	
M13	<i>Clostridium</i>	15.00	9.99E-01	6.66E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+20	
M14	16s - Universal	14.21							2.85E+20
M14	<i>Bifidobacterium</i>	20.33	9.53E-03	6.35E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+18	
M14	<i>Bacteroides</i>	21.81	1.02E-02	6.82E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+18	
M14	<i>Lactobacillus</i>	16.78	1.12E+00	7.45E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.48E+20	
M14	<i>Clostridium</i>	15.19	1.01E+00	6.74E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+20	
M16	16s - Universal	13.90							1.40E+20
M16	<i>Bifidobacterium</i>	26.09	1.06E-03	7.07E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+17	
M16	<i>Bacteroides</i>	18.59	1.03E-01	6.89E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+19	
M16	<i>Lactobacillus</i>	27.69	9.79E-04	6.53E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+17	
M16	<i>Clostridium</i>	14.27	9.50E-01	6.33E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	
M17	16s - Universal	13.84							4.16E+20
M17	<i>Bifidobacterium</i>	15.77	1.05E+00	7.00E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+20	
M17	<i>Bacteroides</i>	16.60	1.11E+00	7.37E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.46E+20	
M17	<i>Clostridium</i>	14.88	9.90E-01	6.60E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+20	
M17	16s - Universal	13.02							

M17	<i>Lactobacillus</i>	26.51	1.08E-03	7.18E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.42E+17	
M18	16s - Universal	13.34							
M18	<i>Bifidobacterium</i>	15.60	1.04E+00	6.92E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+20	
M18	<i>Bacteroides</i>	14.88	9.91E-01	6.61E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+20	
M18	<i>Lactobacillus</i>	24.11	9.80E-04	6.53E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+17	
M18	<i>Clostridium</i>	13.82	1.01E+01	6.75E-01	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+21	1.61E+21
M19	16s - Universal	13.71							
M19	<i>Bifidobacterium</i>	19.90	1.11E-01	7.37E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.46E+19	
M19	<i>Bacteroides</i>	19.06	1.06E-01	7.06E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+19	
M19	<i>Lactobacillus</i>	16.17	1.08E+00	7.18E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.42E+20	
M19	<i>Clostridium</i>	14.57	9.70E-01	6.47E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	2.99E+20
M20	16s - Universal	14.47							
M20	<i>Bifidobacterium</i>	21.31	9.99E-03	6.66E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+18	
M20	<i>Bacteroides</i>	18.82	1.05E-01	6.97E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+19	
M20	<i>Clostridium</i>	13.89	1.02E+01	6.78E-01	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+21	
M20	16s - Universal	13.53							
M20	<i>Lactobacillus</i>	21.68	1.02E-02	6.78E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+18	1.36E+21
M21	16s - Universal	14.04							
M21	<i>Bifidobacterium</i>	17.25	9.58E-02	6.39E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+19	
M21	<i>Bacteroides</i>	17.20	9.55E-02	6.37E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+19	
M21	<i>Lactobacillus</i>	17.34	9.63E-02	6.42E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+19	
M21	<i>Clostridium</i>	14.31	9.54E-01	6.36E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	1.64E+20
M23	16s - Universal	14.57							
M23	<i>Bifidobacterium</i>	24.38	9.91E-04	6.61E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+17	
M23	<i>Bacteroides</i>	18.18	1.01E-01	6.73E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+19	
M23	<i>Clostridium</i>	14.55	9.69E-01	6.46E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	
M23	16s - Universal	13.37							1.42E+20

M23	<i>Lactobacillus</i>	27.27	9.64E-05	6.43E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+16	
M24	16s - Universal	13.90							1.61E+20
M24	<i>Bifidobacterium</i>	18.37	1.02E-01	6.80E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+19	
M24	<i>Bacteroides</i>	17.65	9.81E-02	6.54E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+19	
M24	<i>Lactobacillus</i>	20.93	9.81E-03	6.54E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+18	
M24	<i>Clostridium</i>	15.15	1.01E+00	6.72E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+20	
M25	16s - Universal	14.28							
M25	<i>Bifidobacterium</i>	18.99	1.06E-01	7.03E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+19	
M25	<i>Bacteroides</i>	24.10	9.79E-04	6.53E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+17	
M25	<i>Lactobacillus</i>	19.48	1.08E-01	7.22E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+19	
M25	<i>Clostridium</i>	15.47	1.03E+00	6.87E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+20	
M26	16s - Universal	13.49							1.50E+21
M26	<i>Bifidobacterium</i>	18.01	1.00E-01	6.67E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+19	
M26	<i>Bacteroides</i>	15.37	1.02E+00	6.82E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+20	
M26	<i>Lactobacillus</i>	25.26	1.03E-03	6.84E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+17	
M26	<i>Clostridium</i>	13.90	1.02E+01	6.78E-01	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+21	
M27	16s - Universal	13.45							
M27	<i>Bifidobacterium</i>	17.66	9.81E-02	6.54E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+19	
M27	<i>Bacteroides</i>	18.30	1.02E-01	6.78E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+19	
M27	<i>Lactobacillus</i>	26.29	1.07E-03	7.12E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+17	
M27	<i>Clostridium</i>	14.10	9.38E-01	6.26E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+20	
M28	16s - Universal	13.36							1.52E+21
M28	<i>Bifidobacterium</i>	19.02	1.06E-01	7.04E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+19	
M28	<i>Bacteroides</i>	15.48	1.03E+00	6.87E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+20	
M28	<i>Lactobacillus</i>	26.09	1.06E-03	7.07E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+17	
M28	<i>Clostridium</i>	14.13	1.03E+01	6.90E-01	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+21	
M29	16s - Universal	13.73							

M29	<i>Bifidobacterium</i>	18.55	1.03E-01	6.87E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+19	
M29	<i>Bacteroides</i>	16.29	1.08E+00	7.23E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+20	
M29	<i>Lactobacillus</i>	20.78	9.74E-03	6.49E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+18	
M29	<i>Clostridium</i>	14.49	9.65E-01	6.43E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	
M30	16s - Universal	13.86							
M30	<i>Bifidobacterium</i>	15.96	1.06E+00	7.08E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+20	
M30	<i>Bacteroides</i>	16.00	1.07E+00	7.10E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+20	
M30	<i>Lactobacillus</i>	26.21	1.06E-03	7.10E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+17	
M30	<i>Clostridium</i>	14.64	9.75E-01	6.50E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+20	4.10E+20
M33	16s - Universal	13.63							
M33	<i>Bifidobacterium</i>	26.94	1.12E-04	7.48E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.48E+16	
M33	<i>Bacteroides</i>	17.62	1.00E-01	6.70E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+19	
M33	<i>Lactobacillus</i>	25.97	1.08E-04	7.21E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+16	
M33	<i>Clostridium</i>	14.09	9.54E-01	6.36E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	1.39E+20
M34	16s - Universal	13.66							
M34	<i>Bifidobacterium</i>	19.49	9.55E-03	6.37E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+18	
M34	<i>Bacteroides</i>	18.38	1.05E-01	6.99E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+19	
M34	<i>Lactobacillus</i>	24.15	1.01E-04	6.71E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+16	
M34	<i>Clostridium</i>	14.13	9.56E-01	6.38E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	1.41E+20
M35	16s - Universal	14.07							
M35	<i>Bifidobacterium</i>	16.79	9.57E-02	6.38E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+19	
M35	<i>Bacteroides</i>	26.76	1.11E-04	7.43E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.47E+16	
M35	<i>Lactobacillus</i>	18.46	1.05E-01	7.02E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+19	
M35	<i>Clostridium</i>	14.66	8.28E+00	5.52E-01	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.10E+21	1.13E+21
M36	16s - Universal	13.71							
M36	<i>Bifidobacterium</i>	25.23	1.05E-04	7.01E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+16	
M36	<i>Bacteroides</i>	16.98	9.68E-02	6.45E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+19	1.42E+20

M36	<i>Lactobacillus</i>	23.31	1.01E-03	6.77E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+17	
M36	<i>Clostridium</i>	14.36	9.72E-01	6.48E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+20	
M37	16s - Universal	13.85							
M37	<i>Bifidobacterium</i>	15.95	1.08E+00	7.20E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+20	
M37	<i>Bacteroides</i>	16.00	1.08E+00	7.22E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+20	
M37	<i>Lactobacillus</i>	23.06	1.00E-03	6.69E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+17	
M37	<i>Clostridium</i>	14.81	1.00E+00	6.69E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+20	4.19E+20
M38	16s - Universal	14.09							
M38	<i>Bifidobacterium</i>	20.18	9.89E-03	6.59E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+18	
M38	<i>Bacteroides</i>	18.32	1.04E-01	6.96E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+19	
M38	<i>Lactobacillus</i>	21.71	1.06E-02	7.09E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+18	
M38	<i>Clostridium</i>	14.85	1.01E+00	6.70E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+20	1.50E+20
M39	16s - Universal	13.60							
M39	<i>Bifidobacterium</i>	22.35	9.73E-04	6.49E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+17	
M39	<i>Bacteroides</i>	15.97	1.08E+00	7.21E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+20	
M39	<i>Lactobacillus</i>	25.07	1.04E-04	6.96E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+16	
M39	<i>Clostridium</i>	14.21	9.62E-01	6.41E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	2.70E+20
M40	16s - Universal	13.98							
M40	<i>Bifidobacterium</i>	23.25	1.01E-03	6.75E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+17	
M40	<i>Bacteroides</i>	22.18	9.65E-04	6.44E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+17	
M40	<i>Lactobacillus</i>	24.83	1.03E-04	6.90E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+16	
M40	<i>Clostridium</i>	15.76	1.07E+00	7.12E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+20	1.41E+20
M44	16s - Universal	13.3							
M44	<i>Bifidobacterium</i>	22.37	9.74E-04	6.49E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+17	
M44	<i>Bacteroides</i>	16.16	1.09E+00	7.29E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.45E+20	
M44	<i>Lactobacillus</i>	22.59	9.83E-04	6.56E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+17	
M44	<i>Clostridium</i>	14.05	9.52E-01	6.34E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	2.71E+20

M45	16s - Universal	13.70							
M45	<i>Bifidobacterium</i>	17.46	9.96E-02	6.64E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+19	
M45	<i>Bacteroides</i>	15.72	1.06E+00	7.09E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+20	
M45	<i>Lactobacillus</i>	21.11	1.03E-02	6.90E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+18	
M45	<i>Clostridium</i>	14.49	9.81E-01	6.54E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+20	2.86E+20
M46	16s - Universal	13.55							
M46	<i>Bifidobacterium</i>	24.98	1.04E-04	6.94E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+16	
M46	<i>Bacteroides</i>	15.24	1.03E+00	6.88E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+20	
M46	<i>Lactobacillus</i>	26.08	1.09E-04	7.24E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.44E+16	
M46	<i>Clostridium</i>	14.75	9.99E-01	6.66E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+20	2.68E+20
M47	16s - Universal	13.69							
M47	<i>Bifidobacterium</i>	19.54	9.58E-03	6.39E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+18	
M47	<i>Bacteroides</i>	18.95	1.08E-01	7.20E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+19	
M47	<i>Lactobacillus</i>	24.52	1.02E-04	6.81E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+16	
M47	<i>Clostridium</i>	14.36	9.72E-01	6.48E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+20	1.45E+20
M49	16s - Universal	15.82							
M49	<i>Bifidobacterium</i>	15.61	1.06E+00	7.05E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+20	
M49	<i>Bacteroides</i>	18.18	1.04E-01	6.91E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+19	
M49	<i>Lactobacillus</i>	27.09	1.13E-04	7.53E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.49E+16	
M49	<i>Clostridium</i>	15.76	1.07E+00	7.11E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+20	2.95E+20
M51	16s - Universal	13.18							
M51	<i>Bifidobacterium</i>	17.45	9.95E-02	6.63E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+19	
M51	<i>Bacteroides</i>	14.28	9.67E-01	6.45E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	
M51	<i>Lactobacillus</i>	24.59	1.02E-04	6.83E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+16	
M51	<i>Clostridium</i>	13.78	1.02E+01	6.79E-01	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+21	1.49E+21
M52	16s - Universal	13.32							
M52	<i>Bifidobacterium</i>	18.05	1.03E-01	6.86E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+19	1.57E+20

M52	<i>Bacteroides</i>	16.75	9.55E-02	6.37E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+19	
M52	<i>Lactobacillus</i>	20.16	9.88E-03	6.59E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+18	
M52	<i>Clostridium</i>	14.43	9.77E-01	6.51E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+20	
M53	16s - Universal	13.55							
M53	<i>Bifidobacterium</i>	18.19	1.04E-01	6.91E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+19	
M53	<i>Bacteroides</i>	15.69	1.06E+00	7.08E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+20	
M53	<i>Lactobacillus</i>	25.53	1.06E-04	7.09E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+16	
M53	<i>Clostridium</i>	14.43	9.77E-01	6.51E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+20	2.84E+20
M54	16s - Universal	13.56							
M54	<i>Bifidobacterium</i>	16.98	9.68E-02	6.45E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+19	
M54	<i>Bacteroides</i>	19.39	9.50E-03	6.34E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+18	
M54	<i>Lactobacillus</i>	24.57	1.02E-04	6.83E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+16	
M54	<i>Clostridium</i>	14.36	9.73E-01	6.48E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+20	1.43E+20
M55	16s - Universal	12.87							
M55	<i>Bifidobacterium</i>	18.34	1.05E-01	6.97E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+19	
M55	<i>Bacteroides</i>	15.19	1.03E+00	6.86E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+20	
M55	<i>Lactobacillus</i>	17.71	1.01E-01	6.73E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+19	
M55	<i>Clostridium</i>	14.02	9.50E-01	6.33E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	2.89E+20
M56	16s - Universal	13.69							
M56	<i>Bifidobacterium</i>	18.75	1.07E-01	6.09E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.21E+18	
M56	<i>Bacteroides</i>	17.63	1.01E-01	6.70E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+19	
M56	<i>Lactobacillus</i>	24.86	1.04E-04	6.90E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+16	
M56	<i>Clostridium</i>	14.14	9.58E-01	6.38E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	1.42E+20
M57	16s - Universal	13.61							
M57	<i>Bifidobacterium</i>	20.54	1.01E-04	6.71E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+16	
M57	<i>Bacteroides</i>	17.53	1.00E-01	6.66E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+19	
M57	<i>Lactobacillus</i>	26.32	1.10E-04	7.31E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.45E+16	1.40E+20

M57	<i>Clostridium</i>	14.18	9.60E-01	6.40E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	
M58	16s - Universal	13.48							
M58	<i>Bifidobacterium</i>	28.27	1.18E-04	7.85E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.56E+16	
M58	<i>Bacteroides</i>	22.32	9.72E-04	6.48E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+17	
M58	<i>Lactobacillus</i>	27.25	1.14E-04	7.57E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.50E+16	
M58	<i>Clostridium</i>	15.34	1.04E+00	6.92E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+20	1.37E+20
M59	16s - Universal	13.68							
M59	<i>Bifidobacterium</i>	15.19	1.03E+00	6.86E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.36E+20	
M59	<i>Bacteroides</i>	15.03	1.02E+00	6.79E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+20	
M59	<i>Lactobacillus</i>	28.05	1.17E-04	7.79E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.55E+16	
M59	<i>Clostridium</i>	14.26	9.66E-01	6.44E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	3.99E+20
M60	16s - Universal	12.76							
M60	<i>Bifidobacterium</i>	16.21	9.24E-02	5.27E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.05E+18	
M60	<i>Bacteroides</i>	17.36	9.90E-02	6.60E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+19	
M60	<i>Lactobacillus</i>	23.11	1.01E-03	6.71E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+17	
M60	<i>Clostridium</i>	14.10	9.55E-01	6.37E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	1.40E+20
M61	16s - Universal	13.28							
M61	<i>Bifidobacterium</i>	17.22	9.82E-02	6.55E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.30E+19	
M61	<i>Bacteroides</i>	15.77	1.07E+00	7.12E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+20	
M61	<i>Lactobacillus</i>	17.67	1.01E-01	6.72E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+19	
M61	<i>Clostridium</i>	14.13	9.57E-01	6.38E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+20	2.93E+20
M64	16s - Universal	13.36							
M64	<i>Bifidobacterium</i>	19.49	9.55E-03	6.37E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+18	
M64	<i>Bacteroides</i>	16.39	9.34E-02	6.23E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+19	
M64	<i>Lactobacillus</i>	20.52	1.01E-02	6.71E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+18	
M64	<i>Clostridium</i>	14.22	9.63E-01	6.42E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	1.42E+20
M65	16s - Universal	13.24							1.42E+20

M65	<i>Bifidobacterium</i>	18.20	1.04E-01	6.92E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+19	
M65	<i>Bacteroides</i>	21.92	9.54E-04	6.36E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+17	
M65	<i>Lactobacillus</i>	19.31	9.47E-03	6.31E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.25E+18	
M65	<i>Clostridium</i>	14.21	9.62E-01	6.42E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	
M66	16s - Universal	13.66							2.96E+20
M66	<i>Bifidobacterium</i>	16.61	9.47E-02	6.31E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.25E+19	
M66	<i>Bacteroides</i>	18.72	1.07E-01	7.11E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+19	
M66	<i>Lactobacillus</i>	15.38	1.04E+00	6.94E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+20	
M66	<i>Clostridium</i>	14.64	9.91E-01	6.61E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+20	
M67	16s - Universal	13.38							1.67E+20
M67	<i>Bifidobacterium</i>	17.48	9.96E-02	6.64E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+19	
M67	<i>Bacteroides</i>	17.00	9.69E-02	6.46E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+19	
M67	<i>Lactobacillus</i>	17.45	9.95E-02	6.63E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+19	
M67	<i>Clostridium</i>	14.35	9.72E-01	6.48E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	
M68	16s - Universal	13.14							3.84E+20
M68	<i>Bifidobacterium</i>	16.42	9.36E-01	6.24E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+20	
M68	<i>Bacteroides</i>	14.84	1.00E+00	6.70E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+20	
M68	<i>Lactobacillus</i>	25.51	1.06E-04	7.09E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+16	
M68	<i>Clostridium</i>	14.16	9.59E-01	6.39E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	
M69	16s - Universal	12.77							1.52E+21
M69	<i>Bifidobacterium</i>	20.47	1.00E-02	6.69E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+18	
M69	<i>Bacteroides</i>	15.00	1.02E+00	6.77E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+20	
M69	<i>Lactobacillus</i>	27.19	1.13E-04	7.55E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.50E+16	
M69	<i>Clostridium</i>	14.15	1.05E+01	6.97E-01	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+21	
M72	16s - Universal	14.18							1.34E+20
M72	<i>Bifidobacterium</i>	27.98	1.17E-04	7.77E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.54E+16	
M72	<i>Bacteroides</i>	19.35	9.49E-03	6.32E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.25E+18	

M72	<i>Lactobacillus</i>	29.15	1.21E-04	8.10E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.61E+16	
M72	<i>Clostridium</i>	14.91	1.01E+00	6.73E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+20	
M73	16s - Universal	13.60							
M73	<i>Bifidobacterium</i>	16.54	9.43E-02	6.29E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.25E+19	
M73	<i>Bacteroides</i>	17.37	9.90E-02	6.60E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+19	
M73	<i>Lactobacillus</i>	16.81	9.59E-02	6.39E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+19	
M73	<i>Clostridium</i>	14.98	1.01E+00	6.76E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+20	1.72E+20
M74	16s - Universal	14.13							
M74	<i>Bifidobacterium</i>	18.72	1.07E-01	7.12E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+19	
M74	<i>Bacteroides</i>	18.21	1.04E-01	6.92E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+19	
M74	<i>Lactobacillus</i>	23.40	1.02E-03	6.80E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+17	
M74	<i>Clostridium</i>	14.41	9.77E-01	6.51E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+20	1.57E+20
M75	16s - Universal	14.06							
M75	<i>Bifidobacterium</i>	19.07	9.35E-03	6.23E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+18	
M75	<i>Bacteroides</i>	20.66	1.01E-02	6.75E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+18	
M75	<i>Lactobacillus</i>	24.34	1.01E-04	6.76E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+16	
M75	<i>Clostridium</i>	15.03	1.02E+00	6.78E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+20	1.38E+20
M76	16s - Universal	14.34							
M76	<i>Bifidobacterium</i>	20.26	9.93E-03	6.62E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+18	
M76	<i>Bacteroides</i>	21.36	1.05E-02	6.98E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.38E+18	
M76	<i>Lactobacillus</i>	17.33	9.88E-02	6.59E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+19	
M76	<i>Clostridium</i>	14.87	1.01E+00	6.71E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.33E+20	1.49E+20
M77	16s - Universal	13.84							
M77	<i>Bifidobacterium</i>	24.27	1.01E-04	6.74E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+16	
M77	<i>Bacteroides</i>	15.50	1.05E+00	7.00E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+20	
M77	<i>Lactobacillus</i>	24.38	1.02E-04	6.77E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+16	
M77	<i>Clostridium</i>	14.16	9.58E-01	6.39E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	2.66E+20

M78	16s - Universal	13.78							
M78	<i>Bifidobacterium</i>	21.44	1.05E-02	7.01E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+18	
M78	<i>Bacteroides</i>	19.11	9.37E-03	6.25E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+18	
M78	<i>Lactobacillus</i>	25.69	1.07E-04	7.14E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.42E+16	
M78	<i>Clostridium</i>	14.19	9.61E-01	6.40E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	1.30E+20
M79	16s - Universal	13.22							
M79	<i>Bifidobacterium</i>	26.02	1.08E-04	7.23E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+16	
M79	<i>Bacteroides</i>	18.60	1.06E-01	7.07E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.40E+19	
M79	<i>Lactobacillus</i>	23.25	1.01E-03	6.75E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.34E+17	
M79	<i>Clostridium</i>	14.30	9.68E-01	6.46E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	1.42E+20
M80	16s - Universal	14.15							
M80	<i>Bifidobacterium</i>	25.22	1.05E-04	7.00E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.39E+16	
M80	<i>Bacteroides</i>	16.70	9.52E-02	6.35E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+19	
M80	<i>Lactobacillus</i>	25.69	1.07E-04	7.14E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.42E+16	
M80	<i>Clostridium</i>	14.62	9.90E-01	6.60E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.31E+20	1.44E+20
M81	16s - Universal	13.96							
M81	<i>Bifidobacterium</i>	18.22	1.04E-01	6.92E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.37E+19	
M81	<i>Bacteroides</i>	15.96	1.08E+00	7.21E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.43E+20	
M81	<i>Lactobacillus</i>	21.57	9.39E-04	6.26E-05	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.24E+17	
M81	<i>Clostridium</i>	14.44	9.78E-01	6.52E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.29E+20	2.86E+20
M85	16s - Universal	14.01							
M85	<i>Bifidobacterium</i>	19.69	9.65E-03	6.43E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+18	
M85	<i>Bacteroides</i>	16.53	9.42E-02	6.28E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.25E+19	
M85	<i>Lactobacillus</i>	19.77	9.69E-03	6.46E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+18	
M85	<i>Clostridium</i>	14.16	9.58E-01	6.39E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.27E+20	1.42E+20
M86	16s - Universal	13.52							
M86	<i>Bifidobacterium</i>	25.52	1.06E-04	7.09E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+16	1.41E+20

M86	<i>Bacteroides</i>	16.77	9.56E-02	6.37E-03	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.26E+19	
M86	<i>Lactobacillus</i>	23.92	9.97E-05	6.65E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.32E+16	
M86	<i>Clostridium</i>	14.32	9.70E-01	6.47E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+20	
M88	16s - Universal	14.56							1.38E+20
M88	<i>Bifidobacterium</i>	21.74	1.07E-02	7.11E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.41E+18	
M88	<i>Bacteroides</i>	19.77	9.69E-03	6.46E-04	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.28E+18	
M88	<i>Lactobacillus</i>	27.25	1.14E-04	7.57E-06	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.50E+16	
M88	<i>Clostridium</i>	15.05	1.02E+00	6.79E-02	6.02E+23	4,600.00	6.60E-02	1.35E+20	

