

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise do microbioma intestinal humano de pacientes da população brasileira
com transtorno depressivo e transtorno de ansiedade**

Fernanda Luiza Ferrari

Florianópolis - SC

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise do microbioma intestinal humano de pacientes da população brasileira
com transtorno depressivo e transtorno de ansiedade**

Fernanda Luiza Ferrari

**Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do título de Licenciado em
Ciências Biológicas.**

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva

Coorientadora: Dra. Lia Kubelka Back

Florianópolis - SC

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferrari, Fernanda Luiza

Análise do microbioma intestinal humano de pacientes da população brasileira com transtorno depressivo e transtorno de ansiedade / Fernanda Luiza Ferrari ; orientador, Guilherme Toledo-Silva, coorientador, Lia Kubelka Fernandes de Carlos Back, 2022.

79 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. shotgun. 3. metagenômica. 4. metabolismo energético. 5. metabolismo de aminoácidos. I. Toledo-Silva, Guilherme. II. Back, Lia Kubelka Fernandes de Carlos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para a obtenção do Título de “Licenciada em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Local, 11 de março de 2022.

Profª. Dra. Daniela Cristina de Toni
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Dra. Manuella Pinto Kaster
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Liliane Conteville
Avaliadora
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe que infelizmente não conseguiu vencer a depressão e adiantou a hora da sua partida.

AGRADECIMENTOS

Costumo encarar a vida como um grande balanço, com cordas intermináveis que balançam em frente a um penhasco. Existe um conflito de sentimentos; o medo de cair e a empolgação vinda da adrenalina. Muitas vezes, esse grande balanço perde o controle, perde a direção ou até mesmo o embalo. Neste momento nos sentimos sozinhos, vulneráveis e incapazes de dar o embalo necessário para que o balanço volte a direção e ao ritmo esperado. E é aí, nesse mágico e assustador instante da vida, nesse subir e descer do balanço que nós nos encontramos com pessoas fundamentais que nos ajudam a manter o ritmo, a construir sonhos e a realizar nossos objetivos.

Se hoje concluo essa etapa tão sonhada da minha trajetória, é porque tive pessoas essenciais que me orientaram, me apoiaram e estiveram ao meu lado em momentos fundamentais.

Agradeço primeiramente a Deus por ser paciente com minhas falhas e nunca me abandonar, agradeço a minha mãe pela vida gerada, pelo amor incondicional e por me ensinar a sempre ter coragem. Agradeço ao meu pai por ter sido o pai que todo mundo sonha em ter, por se preocupar comigo em todos os momentos e a me ensinar a bondade. Agradeço a minha irmã Flávia por me aguentar mesmo eu sendo aquela típica chata irmã mais velha, e também por ser minha inspiração todos os dias. Agradeço também o meu companheiro Jhetro por todo apoio e incentivo em cada etapa cursada até aqui. Agradeço também a minha Tia Neusa por se fazer presente e me apoiar nos momentos difíceis. Agradeço às minhas amigas de toda vida Chaiene, Indiene e Amanda pelo apoio e por entenderem que nem sempre pude estar presente.

Não poderia deixar de agradecer meu super orientador Guilherme, que foi não apenas um orientador mas um amigo e acreditou em mim, mesmo quando eu mesma não acreditei, me dando todo suporte para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Genômica da UFSC, do qual carinhosamente digo que é minha casa na UFSC, em especial a Bruna, Ariane e Ramon. Agradeço aos meus amigos de graduação que tornaram a jornada mais divertida, Evelin, Jeniffer, Keanu, Leticia. Agradeço aos mestres que passaram pela minha trajetória acadêmica, em especial à professora Dra. Yara Muniz que é de uma inteligência e zelo admirável. Agradeço a Biogenetika pela disponibilização dos dados, em especial a Dra. Lia que me auxiliou nessa jornada de conhecer o microbioma humano e por me receber no laboratório de braços abertos. Agradeço também os colegas que aguentaram meu mau humor pré TCC. Agradeço também a minha psicóloga Carol pois não me deixou enlouquecer nessa reta final. E claro agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina por me permitir realizar esse sonho em uma universidade com qualidade excepcional.

RESUMO

A microbiota humana consiste em cerca de 10-100 trilhões de células microbianas simbióticas, o microbioma (MB) consiste nos genes que essas células carregam. O MB pode ser entendido como um ecossistema onde todos os organismos podem interagir entre si e com o ambiente. Em um indivíduo saudável, a microbiota patogênica e simbiótica coexistem sem problemas. Porém, o MB é dinâmico e muda influenciado por diferentes fatores, como dieta, uso de antibióticos, doenças entre outros. Se houver um distúrbio nesse equilíbrio ocorre a disbiose, interrompendo essas interações normais. Como resultado, o corpo pode se tornar mais suscetível às doenças. A depressão (DEP) é um transtorno psiquiátrico altamente prevalente, afetando o indivíduo de diferentes formas e pode ser acompanhada por outras perturbações psiquiátricas, tais como ansiedade (ANS). Os mecanismos biológicos envolvidos na DEP e ANS ainda não são bem compreendidos, mas a relação entre a DEP/ANS e as alterações na microbiota já é amplamente aceita. Neste trabalho, avaliamos o microbioma intestinal (MBI) de 29 indivíduos saudáveis (CON) e 29 pacientes afetados pela DEP e DEP/ANS da população brasileira. As amostras de DNA de fezes dos pacientes foram sequenciadas, utilizando a metodologia *Shotgun*. Os programas Metaphlan e Humann3 foram utilizados para inferir a abundância taxonômica e funcional das amostras. Posteriormente, com o pacote MaAsLin2 foi realizada uma análise diferencial de abundância para procurar possíveis alterações significativas entre grupos ($p < 0,05$). O perfil da MBI de pacientes da população brasileira utilizada como controle é composta majoritariamente por Bacteroidetes e Firmicutes em nível de filo, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Eubacterium* e *Roseburia* em nível de gênero. O perfil da microbiota de pacientes da população Brasileira acometida por DEP e DEP/ANS é composta majoritariamente por Bacteroidetes e Firmicutes em nível de filo, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Eubacterium* e *Akkermansia* em nível de gênero. Foram encontrados um total de 95 táxons em abundância diferencial entre pacientes CON vs DEP e CON vs DEP/ANS. O filo Bacteroidetes mostrou uma abundância reduzida em pacientes DEP, *Bacteroides spp.* estão envolvidos na produção de metabolitos relevantes para a DEP, tais como GABA. Diferentes estudos apontam para uma associação entre DEP e deficiência GABAérgica. Ainda, foram encontradas 32 vias diferencialmente abundantes. Pacientes com DEP, apresentaram alterações em diferentes vias relacionadas com metabolismo de carboidratos/aminoácidos e relacionadas com energia. O equilíbrio energético desempenha um papel essencial no funcionamento biológico normal e o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) participa na regulação de diferentes sistemas, incluindo o sistema metabólico. Alterações no metabolismo do açúcar e no metabolismo energético podem ser resultado de distúrbios no eixo HPA. Desta forma, é possível concluir que indivíduos acometidos com DEP e ANS podem apresentar diversas alterações no microbioma intestinal. Alterações essas, que podem impactar o sistema imunológico afetando o indivíduo de uma maneira psíquica, mas também física. As nossas descobertas corroboram pesquisas anteriores e podem servir de base para uma maior compreensão do desenvolvimento da DEP e da ANS, especialmente em pacientes da população brasileira.

Palavras-chave: *shotgun*, metagenômica, metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos

ABSTRACT

The human microbiota consists of about 10-100 trillion symbiotic microbial cells, the microbiome (MB) consists of the genes that these cells carry. The MB can be understood as an independent and self-sufficient ecosystem, where all organisms can interact with each other and the environment. In a healthy individual, the pathogenic and symbiotic microbiota coexist without problems. However, the MB is dynamic and changes influenced by different factors, such as diet, antibiotic use, disease, and so on. If there is a disturbance in this balance, dysbiosis occurs, disrupting these normal interactions. As a result, the body can become more susceptible to disease. Depression (DEP) is a common illness around the world, affecting the individual in different ways, and can be accompanied by other psychiatric disorders such as anxiety (ANS). The biological mechanisms involved in DEP and ANS are still not well understood, but the relationship between DEP/ANS and alterations in the microbiota is already widely accepted. In this work, we evaluated the gut microbiome (MBI) of 29 healthy individuals (CON) and 29 patients affected by DEP and DEP/ANS from the Brazilian population. Stool DNA samples from the patients were sequenced, using Shotgun methodology. The Metaphlan and Humann3 programs were used to infer the taxonomic and functional abundance of the samples. Subsequently, with the MaAsLin2 package a differential abundance analysis was performed to look for possible significant changes between groups ($p < 0.05$). The MBI profile of the control individuals was mostly composed of Bacteroidetes and Firmicutes at phylum level, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Eubacterium* and *Roseburia* at genus level. The microbiota profile of the individuals affected by DEP and DEP/ANS was composed mostly of Bacteroidetes and Firmicutes at the phylum level, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Eubacterium* and *Akkermansia* at the genus level. A total of 95 taxa were found in differential abundance between CON vs DEP and CON vs DEP/ANS patients. The phylum Bacteroidetes showed a reduced abundance in DEP patients, *Bacteroides* spp. are involved in the production of DEP relevant metabolites such as GABA. Different studies point to an association between DEP and GABAergic dysfunction. Furthermore, 32 differentially abundant pathways were found. Patients with DEP, showed alterations in different pathways related to carbohydrate/amino acid metabolism and related to energy. Energy balance plays an essential role in normal biological functioning and the HPA axis participates in the regulation of different systems, including the metabolic system. Changes in sugar metabolism and energy metabolism can be a result of disturbances in the HPA axis. Thus, we can conclude that individuals affected with DEP and ANS may have various alterations in the gut microbiome. These changes might impact the immune system, affecting the individual in a psychological as well as physical way. Our findings corroborate previous research and may serve as a basis for further understanding the development of DEP and ANS, especially in patients from the Brazilian population.

Keywords: shotgun, metagenomics, energy metabolism, amino acid metabolism

Lista de Figuras

Figura 1. Prevalência de transtornos depressivos (% da população) por região e sexo.....	16
Figura 2. Prevalência de transtornos de ansiedade (% da população) por região e sexo.....	17
Figura 3. Eixo intestino-cérebro.....	20
Figura 4. Fluxograma da metodologia resumindo os passos realizados na presente pesquisa....	25
Figura 5. Sintomas relatados.....	33
Figura 6. Abundância de filós por grupo.....	35
Figura 7. Índices de diversidade.....	36
Figura 8. PCOA.....	37
Figura 9. Processos biológicos e funções moleculares diferencialmente abundantes.....	41
Figura 10. Termos do Kegg orthology diferencialmente abundantes.....	42
Figura 11. Termos do pfam diferencialmente abundantes.....	43
Figura 12. Vias metabólicas diferencialmente abundantes.	44
Figura 13. Abundância das categorias das vias metabólicas.....	45
Figura 14. Ilustração da composição da microbiota intestinal de indivíduos controle	48
Figura 15. Ilustração da composição da microbiota intestinal de indivíduos acometidos com depressão e ansiedade	50
Figura 16. Ilustração da composição da microbiota intestinal de indivíduos acometidos com depressão.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Prevalência de desordens depressivas e de ansiedade por país.....	18
Tabela 2 Principais trabalhos da literatura científica relacionados à depressão e ansiedade.....	23
Tabela 3. Metadados dos pacientes	29
Tabela 4. Número médio de táxons encontrados em cada grupo por táxon.....	34
Tabela 5. Gêneros diferentemente abundantes no grupo T_DEP.....	38
Tabela 6. Gêneros diferentemente abundantes no grupo T_DEP_ANS.....	39
Tabela 7. Espécies diferentemente abundantes no grupo T_DEP.....	39
Tabela 8. Espécies diferentemente abundantes no grupo T_DEP_ANS.....	40

Lista de siglas

ANS - Ansiedade

CON - Controle

DEP - Depressão

GABA - Ácido gama-aminobutírico

HPA - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

MB - Microbioma

MBH - Microbioma humano

MBI - Microbioma Intestinal

SCFAs - Ácidos graxos de cadeia curta

T_DEP - Transtorno depressivo

T_DEP_ANS - Transtorno depressivo e transtorno de ansiedade

Epígrafe

*“Nós nunca nos realizamos.
Somos dois abismos – um poço fitando o céu.”*

Fernando Pessoa - Livro do Desassossego, p. 56

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 Microbioma intestinal	14
1.2 Depressão, Ansiedade e Eixo intestino-cérebro	16
1.3 Sequenciamento Shotgun (Whole Genome sequencing Shotgun)	20
1.4 Estado da Arte	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3.OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivo específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Fluxograma de metodologia	24
4.2 Dados de sequenciamento de amostras biológicas	26
4.3 Análises de Bioinformática	26
4.3.1 Tratamento dos dados, Análise Taxonômica e Funcional	26
4.3.2 Análise de Abundância Diferencial de táxons e vias	27
4.3.3 Análise de diversidade alfa, beta e índice de saúde	28
4.3.4 Testes estatísticos	28
4.3.5 Visualização de dados	28
5. RESULTADOS	28
5.1 Análise exploratória dos dados	28
5.1.1 Dados Gerais sobre os pacientes	28
5.1.2 Número de táxons	34
5.2 Análise de taxonomia	34
5.3 Índice de diversidade	35
5.4 ABUNDÂNCIA DIFERENCIAL	37
5.4.1 Abundância Diferencial taxonômica	37
5.4.2 Abundância diferencial de genes	40
5.4.3 Abundância diferencial de vias	44
6. DISCUSSÃO	46
6.1 Análise exploratória dos dados	46
6.2 Análise de taxonomia	46
6.2.1 Perfil dos pacientes controle	46
6.2.1 Perfil dos pacientes acometidos com depressão e depressão/ ansiedade	49
6.3 ABUNDÂNCIA DIFERENCIAL	52
6.3.1 Abundância diferencial taxonômica	52
6.3.1.1 Concordância com a literatura	52
6.3.1.2 Táxons modificadores de SFCA's	53
6.6.1.3 Táxons relacionados com neurotransmissores	53
6.3.2 Abundância diferencial de genes e vias metabólicas	54

6.3.2.1 Aspartato	54
6.3.2.2 Ciclo da uréia	54
6.3.2.3 Metabolismo de Aminoácidos e Carboidratos	54
6.3.2.4 Resistência a antibiótico	55
7. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	56
8. LIMITAÇÕES E FATORES DE IMPACTO	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
10. ANEXOS	68

1.INTRODUÇÃO

1.1 Microbioma intestinal

A microbiota humana consiste em cerca de 10-100 trilhões de células microbianas simbióticas, o microbioma (MB) consiste nos genes que essas células carregam (TURNBAUGH et al., 2007; URSEL et al., 2012). O MB pode ser entendido como um ecossistema, onde todos os organismos podem interagir entre si e com o ambiente (THE MICROSETTA INITIATIVE, 2021). Em um indivíduo saudável, a microbiota patogênica e a microbiota simbiótica coexistem sem problemas. Porém, o MB é dinâmico e influenciado por diferentes fatores: dieta, uso de medicamentos, doenças, entre outros. Um intestino humano saudável pode abrigar até 1.000 espécies diferentes de bactérias, compreendendo dois filos principais: *Bacteroidetes e Firmicutes* (AMON; SANDERSON, 2017). Contudo, um distúrbio nesse equilíbrio leva a condição de disbiose (desequilíbrio entre a microbiota patogênica e a simbiótica), interrompendo essas interações normais. Como resultado, o corpo pode se tornar mais suscetível a doenças (SCHOOL OF PUBLIC HEALTH, 2021).

É de grande importância entender quais consequências as mudanças na composição do MB podem ter para a saúde humana e susceptibilidade a doenças. Com o avanço de técnicas de sequenciamento e de bioinformática, já é possível conhecer o microbioma humano (MBH) e inferir a sua relação com a saúde (URSEL et al, 2012). O MBH apresenta uma diversidade de sinais e funções moleculares, que podem ser indicativos de saúde do indivíduo (PETROSINO, 2018). O microbioma intestinal (MBI) participa desde a digestão e absorção de nutrientes, como também na síntese e produção de substratos como ácidos graxos de cadeias curtas (SCFAs) e enzimas (CRESCI; IZZO, 2019). Os SCFAs são extremamente importantes para modular respostas imunológicas e como fonte de energia, produção de vitaminas e neurotransmissores (UNGER et al., 2016).

O MB é mais uma importante fonte de informações dentro do que chamamos de medicina de precisão. Diferentes espécies e cepas podem estar associadas a diferentes doenças e fenótipos, sendo fundamentais para compreender condições complexas. Isso se dá em virtude da capacidade do MB modular o sistema imunológico do hospedeiro, influenciar nos níveis de inflamação do intestino e interferir em processos neurológicos, endócrinos e fisiológicos (KUNTZ; GILBERT, 2017). Porém, relacionar níveis taxonômicos com doenças

nem sempre é algo concordante. A análise de genes, vias metabólicas e funções moleculares presentes na diversidade da microbiota se torna uma necessidade (PETROSINO, 2018). Compreender como cada indivíduo, ou um grupo de indivíduos com determinado perfil respondem a doença auxiliará em futuros prognósticos e tratamentos, obtendo melhorias nos impactos da clínica médica (KUNTZ; GILBERT, 2017).

Pesquisas que associam doenças complexas com o MB já são uma realidade, dois artigos publicados em 2018 (GOPALAKRISHNAN et al., 2018; ZHU et al., 2018) demonstraram que as bactérias intestinais podem interferir nas respostas dos pacientes à imunoterapia contra o câncer (melanoma). O gênero bacteriano *Faecalibacterium* apresenta uma associação positiva em resposta à terapia, enquanto *Bacteroidales* possui uma associação negativa (GOPALAKRISHNAN et al., 2018). Pesquisas como essas, que busquem entender as relações entre doença e o MB, podem favorecer a aplicação da medicina de precisão. Principalmente, com a modulação da MB do hospedeiro com intuito de estimular uma resposta sistêmica a diferentes sintomas e doenças que acometem os indivíduos. Em 2018, Zhu e colaboradores demonstraram que a modulação do MB pode ser utilizada como um tratamento efetivo para doença inflamatória gastrointestinal.

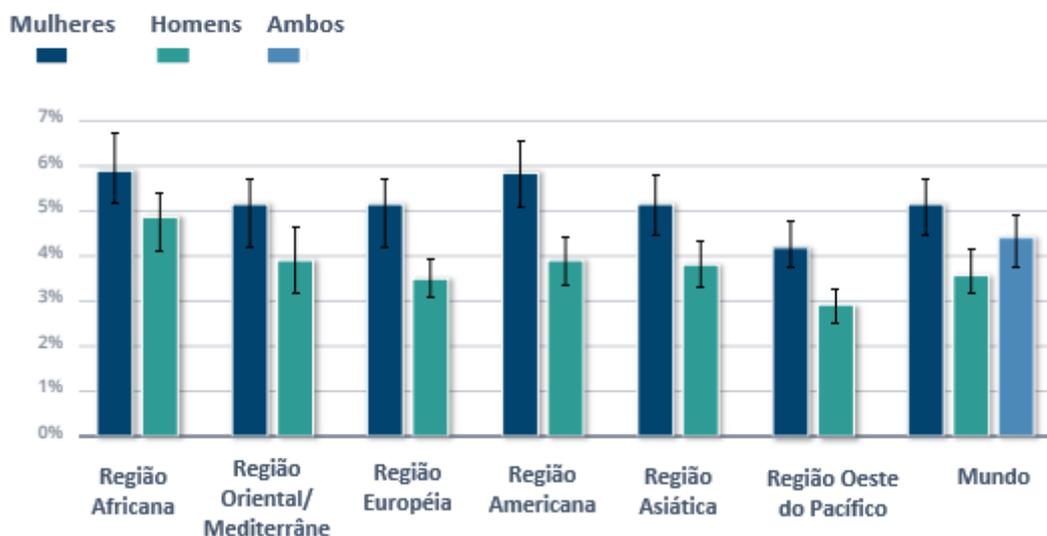
Contudo para que pesquisas como essa continuem sendo realizadas, dados provenientes de sequenciamento metagenômico são necessários. Hoje diversos bancos de dados públicos como MetaHIT, Ensembl, ICGC, GenBank, NIH Project, American Gut; uBiome (Anexo 1) armazenam e disponibilizam dados e arquivos de diferentes tipos de sequenciamento. Porém, dados de sequenciamento de metagenômico shotgun de MB são mais escassos, e não existem dados representativos da população brasileira. Isso acaba sendo uma barreira visto que, hoje já sabemos que cada população possui um MB característico, bem como respostas diferentes aos mesmos estímulos (AMON; SANDERSON, 2017; A GILBERT et al., 2018) A. Dessa forma, para buscar tratamentos e resultados mais assertivos, estudar a nossa população se faz fundamental.

É imprescindível que pesquisas sobre como o MB afeta as doenças sejam realizadas de forma contínua, pois somente dessa forma será possível compreender todo potencial do MB na sua utilização para a medicina de precisão.

1.2 Depressão, Ansiedade e Eixo intestino-cérebro

Depressão (DEP) é uma doença extremamente prevalente em todo o mundo, e que se caracteriza por afetar o indivíduo em seu modo de sentir, pensar e agir, trazendo grande sofrimento para o indivíduo bem como para a família. Quadros depressivos estão associados à mortalidade por suicídio. O indivíduo pode apresentar tristeza persistente, sentimentos de desesperança e/ou pessimismo, sentimentos de culpa, perda de interesse em atividades que antes eram prazerosas, dificuldade de concentração, entre outros. Para que o diagnóstico seja concluído, o paciente deve apresentar os sintomas por ao menos duas semanas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2021.). Dentre os fatores de risco para o surgimento da doença pode-se destacar: histórico familiar, estresse ou traumas, certas doenças físicas e medicamentos. A DEP afeta a população globalmente, porém mulheres são mais propensas a ter DEP do que os homens (Figura 1) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 1. Prevalência de transtornos depressivos (% da população) por região e sexo. Gráfico de barras demonstrando a prevalência de transtornos depressivos por região e área. No eixo x as regiões, no eixo y a prevalência. As cores demonstram o sexo do qual a barra representa.

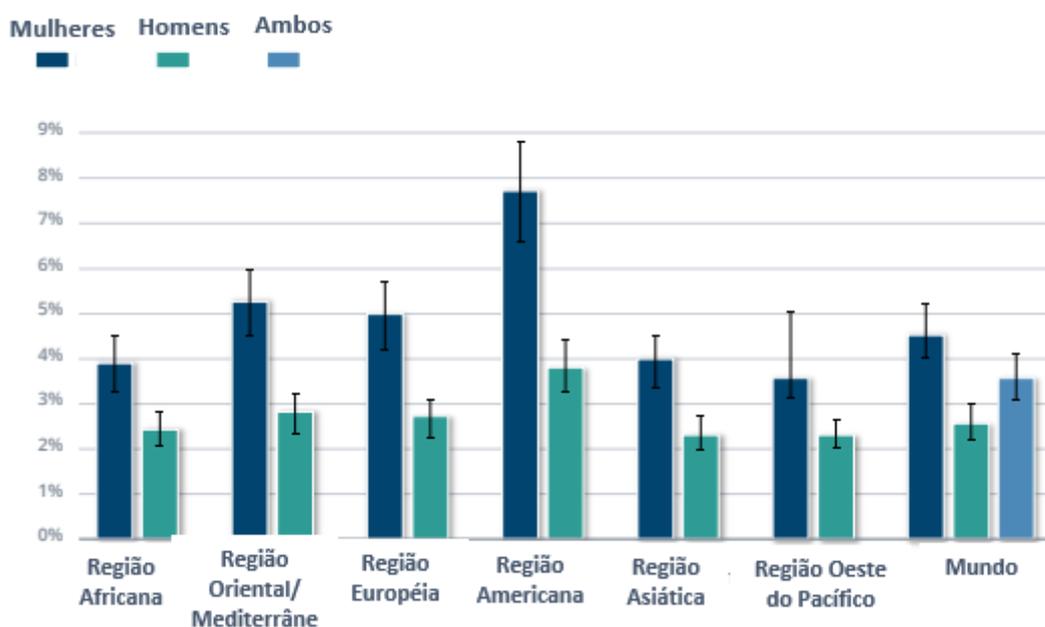


Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017

Muitas vezes a DEP pode vir acompanhada de outros transtornos psiquiátricos como o transtorno ansiedade generalizada (ANS). A ANS é um transtorno psiquiátrico crônico comum caracterizado por preocupação excessiva e sintomas de excitação fisiológica, como

inquietação, insônia e tensão muscular (HOGE et al., 2012). Para ser diagnosticada, deve durar pelo menos seis meses e ser acompanhada de pelo menos três dos seguintes sintomas: inquietação, irritabilidade, fadigabilidade, perturbação do sono, tensão muscular e/ou dificuldade de concentração (APA GUIDE, 2013). Sabe-se ainda da forte associação do comportamento suicida com transtornos psiquiátricos (88%-98%), inclusive os de ANS (THIBODEAU et al., 2013). Assim como a DEP, a ANS acomete mais mulheres do que homens (Figura 2) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Figura 2. Prevalência de transtornos de ansiedade (% da população) por região e sexo. Gráfico de barras demonstrando a prevalência de transtornos depressivos por região e área. No eixo x as regiões, no eixo y a prevalência. As cores demonstram o sexo do qual a barra representa.



Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017

Um estudo realizado em 2017, pela Organização Mundial da Saúde - OMS apontou que o Brasil está no quinto lugar em prevalência de DEP na população e em primeiro lugar na prevalência de ANS (Tabela 1). As regiões com maior prevalência também apresentaram maior número de suicídios (BONADIMAN, 2020).

Tabela 1. Prevalência de desordens depressivas e de ansiedade por país. Tabela demonstrando a prevalência de desordens por país. Na coluna Localidade encontram-se os países dos quais se referem a

prevalência. Na coluna **Desordens Depressivas** o número de indivíduos com algum transtorno depressivo e sua respectiva prevalência. Na coluna **Desordens de Ansiedade** o número de indivíduos com algum transtorno de ansiedade e sua respectiva prevalência. Em verde destacam-se os dados referente a prevalência no Brasil.

Localidade	Desordens Depressivas	%	Desordens de Ansiedade	%
Estados Unidos	17,497,047	5.9	18,711,966	6.3
Brasil	11,548,577	5.8	18,657,943	9.3
Cuba	605,879	5.5	675,037	6.1
Barbados	14,586	5.4	16,640	6.1
Bahamas	19,138	5.2	22,721	6.2
Paraguai	332,628	5.2	483,755	7.6
Trindade e Tobago	67,614	5.2	79,574	6.1
Antígua e Barbuda	4,424	5.1	5,327	6.1
Uruguai	158,005	5	203,815	6.4
Chile	844,253	5	1,100,584	6.5

Fonte: Tabela adaptada do WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017.

Embora a DEP seja uma condição comum, os mecanismos biológicos envolvidos por trás da doença ainda não estão bem esclarecidos. Diversos estudos e pesquisas tentaram associar a disfunção em sistemas de neurotransmissores, anormalidades neuro anatômicas entre outros, porém nenhuma dessas hipóteses conseguiu explicar completamente os mecanismos envolvidos com a DEP (BERLIM; TURECKI, 2007; GUILLOUX et al., 2012).

Pesquisas demonstram evidências da conexão existente entre cérebro e intestino. Por mais que essa relação entre a DEP e alterações na MBI ainda sejam um pouco complexas, essa ligação já é amplamente aceita (DINAN; CRYAN, 2012 ; SANADA et al., 2020), sugerindo que a MBI pode estar modulando os sintomas depressivos por meio da comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro (DINAN; CRYAN, 2012 ; FOSTER E MCVEY NEUFELD, 2013).

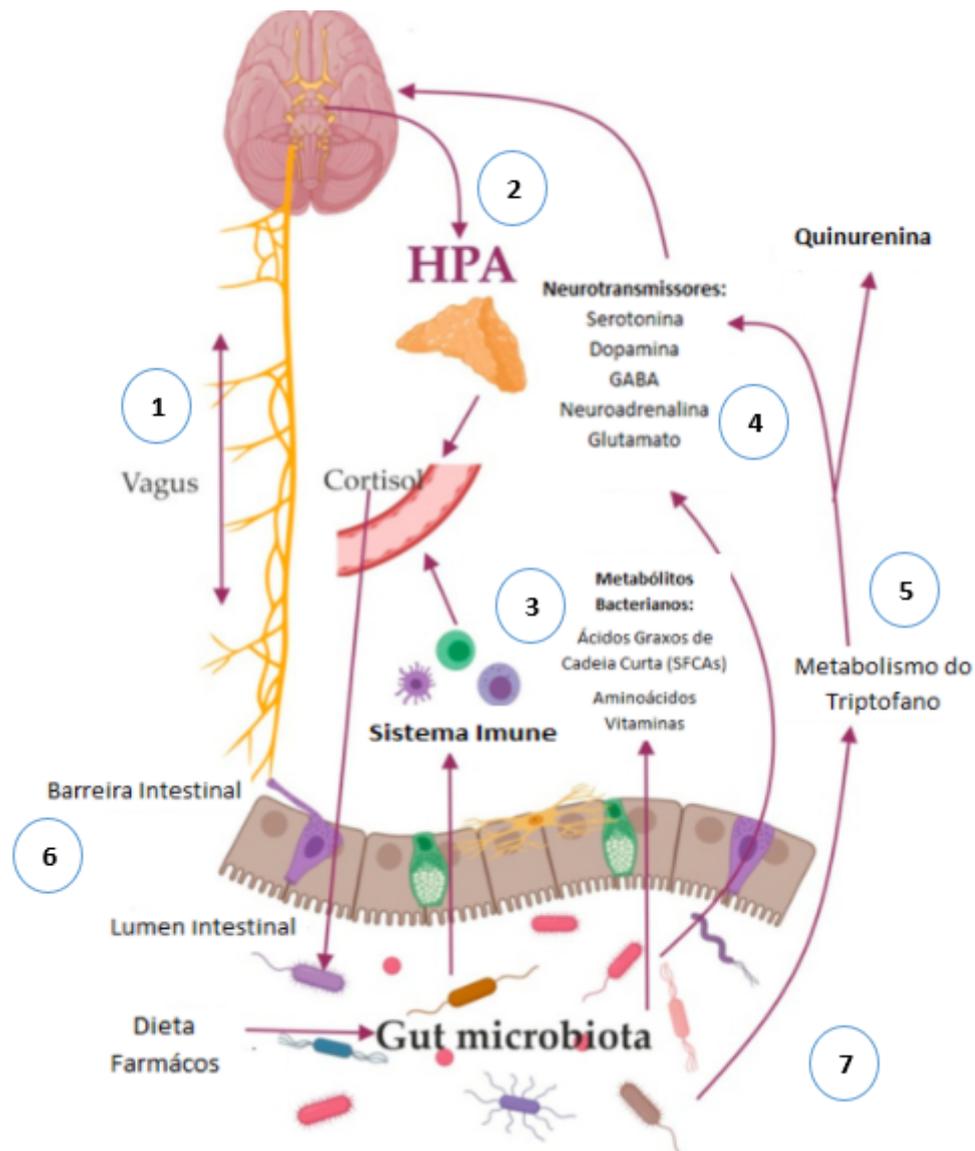
A comunicação entre a MBI e o sistema nervoso pode ser realizada através de mecanismos neurais, hormonais ou imunológicos. Diversos compostos neuroativos são gerados pelas bactérias como catecolaminas, norepinefrina, dopamina, histamina e serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA). Esses compostos podem interagir diretamente com os receptores do sistema nervoso entérico, afetando o sistema nervoso central (ZHOU, FOSTER, 2015).

Em 2015, Jiang e colaboradores, demonstraram que pacientes com transtorno de DEP grave têm uma composição de microbiota fecal diferente em comparação a pacientes controles, apresentando um aumento dos filos Bacteroidetes, Proteobacteria e diminuição de Firmicutes.

A prevalência desses filos pode ser importante para a saúde mental devido à produção de SCFA (VAN DE WOUW et al., 2018). Os SCFAs são importantes para manter a barreira e integridade intestinal, e alterações na sua produção podem prejudicar a resposta imunológica (MORRIS et al., 2017). Naseribairoufei e colaboradores (2014) demonstraram que o gênero *Oscillibacter* estava associado ao fenótipo depressivo e o ácido valérico (SFCA) atuava de maneira semelhante ao GABA o que sugeriria um envolvimento direto na DEP.

Transtornos de DEP sofrem grande influência de vias de estresse, como o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), e muitas dessas vias podem ser fortemente modificadas pela composição do MBI (LUO et al., 2018; SUDO et al., 2004). O eixo HPA é um mecanismo neuroendócrino de resposta ao estresse, e anormalidades no eixo HPA têm sido relatadas em pacientes com transtornos psiquiátricos (HOLTZHEIMER, NEMEROFF, 2006). Alterações nas vias de estresse mobilizam as células imunológicas que desencadeiam um processo estressor. Há um aumento da permeabilidade epitelial intestinal para aumentar a disponibilidade de água e sódio e devido à maior permeabilidade, endotoxinas podem entrar na circulação e iniciar uma resposta imunológica que é denominada “endotoxemia” (PUNDER; PRUIMBOOM, 2015). Essa resposta desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias do cérebro (GATTI; BARTFAI, 1993, LAYE; PARNET; GOUJON; DANTZER, 1994) o que pode influenciar diretamente na manifestação de sintomas e comportamentos depressivos.

Figura 3. Eixo intestino-cérebro. Esquema gráfico demonstrando as possíveis formas de conexão e comunicação entre o intestino e o cérebro. 1. Comunicação intestino cérebro via nervo-vagus. 2. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) de resposta ao estresse. 3. Produção de metabólitos bacterianos que podem afetar o sistema imune. 4. Produção de neurotransmissores. 5. Via de metabolismo do triptofano que é precursor de serotonina. 6. Barreira intestinal que fornece proteção evitando processos inflamatórios no intestino. 7. Microorganismos que habitam a microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de AVERINA et al. 2020

Desta forma, estudos e pesquisas que busquem compreender melhor os elos de ligação e como se dá a influência do eixo intestino-cérebro, são cada vez mais importantes, pois podem trazer respostas e indícios de como a DEP se manifesta e impacta fisicamente no metabolismo do indivíduo afetado.

1.3 Sequenciamento *Shotgun* (*Whole Genome sequencing Shotgun*)

O sequenciamento metagenômico *Shotgun* é uma técnica que permite identificar diferentes organismos e a sua abundância no MB sequenciado. A técnica de sequenciamento mais popular - 16S - sequenciamento de amplicons, permite que uma comunidade seja

amostrada e dela o DNA é extraído de todas as células. Após um marcador genômico de interesse, comum a praticamente todos os organismos, é então direcionado e amplificado por PCR. Os amplicons resultantes são sequenciados e caracterizados através de ferramentas bioinformáticas para determinar quais microorganismos estão presentes na amostra e em que abundância relativa. Embora esse método seja poderoso, ele possui algumas limitações, como o fato de não ser possível atribuir as funções biológicas associadas aos táxons encontrados (SHARPTON, 2014). Nesse sentido surge o sequenciamento metagenômico *Shotgun*, o qual novamente temos a extração do DNA de todas as células de uma comunidade. Mas, ao invés de amplificar apenas fragmentos específicos, temos todo o DNA dividido em pequenos fragmentos que são sequenciados de forma independente. Isso resulta em sequências de DNA (leituras) que se alinham a várias regiões dos genomas presentes na amostra. Alguns dessas leituras serão amostrados a partir de *loci* genômicos taxonomicamente informativos e outros a partir de sequências de codificação. O resultado dessa técnica nos permite responder além de quais microorganismos estão presentes, mas também quais são as suas funções biológicas (SHARPTON, 2014).

1.4 Estado da Arte

A organização da saúde considera transtornos psiquiátricos como o transtorno depressivo, os mais onerosos dentro da sociedade, podendo se tornar a principal fonte de incapacidade do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). São doenças multifatoriais, complexas que podem afetar diversos órgãos e sistemas causando prejuízos a qualidade de vida do indivíduo e sendo a causa principal de suicídios. Com isso, diversas pesquisas surgiram trazendo achados importantes que começam a esclarecer alguns dos mecanismos importantes da ligação entre o cérebro e o intestino (Tabela 2).

A pesquisa médica utiliza comumente uma espécie de animal como modelo com intuito de reproduzir características fisiológicas e comportamentais do homem, sendo os roedores os mais utilizados para experimentos relacionados ao estresse e depressão/ansiedade (SILVA et al, 2012). Estudos relataram que ratos submetidos a estresse crônico tiveram respostas do comportamento semelhantes a sintomas da DEP. Foi observado um aumento no filo Actinobactérias e uma diminuição do filo Tenericutes, já em nível de gênero destacou-se um aumento de *Butricinomas* (YANG et al., 2017). Outro estudo de Szyszkowicz e colaboradores (2017) demonstrou que os filós Verrucomicrobia e Proteobacteria aumentavam

em ratos submetidos a estresse crônico. Já em humanos, Naseribafrouei e colaboradores em 2014 relataram que pacientes com DEP apresentavam uma diminuição no filo Bacteroidetes e aumentos nos gêneros *Alistipes* e *Oscilibacter*. Rong e colaboradores em 2019 corroboraram o achado de diminuição de Bacteroidetes porém outras pesquisas, como Jiang e colaboradores em 2015, encontraram um aumento no mesmo filo, assim como a pesquisa de Stevens e colaboradores em 2018, referente a pacientes com ansiedade.

No geral, diferentes estudos demonstraram alterações significativas na composição da microbiota intestinal de pacientes com DEP e DEP/ANS. Os mais importantes e numerosos achados em nível de filo são um aumento de Bacteroidetes, Actinobacteria e Verrucomicrobia e diminuição de Firmicutes, enquanto gênero *Alistipes*, *Oscilibacter*, *Blautuia*, *Arkkemmansia* e *Ruminococcus* foram os mais encontrados, variando a sua abundância (maior/menor) (Tabela 2) (Naseribafroueu et al., 2014; Jiang et al. 2015, Zheng et al., 2016; Szyszkowicz et al., 2017; Yu et al., 2017; Chen et al., 2018; Stevens et al., 2018; Rong et al., 2019). Possivelmente outros fatores, como dieta, uso de fármacos, genética do indivíduo entre outros também podem estar influenciando diretamente na resposta à doença.

Tabela 2 Principais trabalhos clínicos da literatura científica relacionados à microbiota, depressão e ansiedade. Na coluna um o autor principal e o ano de publicação. Na coluna dois os filos e gêneros apontados nas pesquisas. Na coluna três os possíveis metabólitos envolvidos e na coluna quatro o transtorno a que se refere. SFCA: ácidos graxos de cadeia curta.

Autor	Tamanho da amostra	Organismo	Achados	Metabólitos potencialmente envolvidos	Desordem
Naseribafrouei et al., 2014	55	Humano	Filo: Bacteroidetes↓Gênero: <i>Alistipes</i> , <i>Oscillibacter</i> ↑	Não mencionado	Depressão
Jiang et al., 2015	76	Humano	Filo: Bacteroidetes, Proteobacteria↑; Firmicutes↓ Gênero: <i>Alistipes</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Clostridium</i> ↑; <i>Bacteroides</i> , <i>Faecalibacterium</i> ↓	Não mencionado	Depressão
Kelly et al., 2016	67	Humano	Gênero: <i>Eggerthella</i> , <i>Holdemania</i> , <i>Gelria</i> , <i>Turicibacter</i> , <i>Paraprevotella</i> , <i>Anaerofilum</i> ↑; <i>Prevotella</i> and <i>Dialister</i> ↓	SCFA; Kynurenine/triptofano	Depressão
Zheng et al., 2016	102	Humano	Filo: Actinobacteria↑; Bacteroidetes↓	Metabolismo de carboidratos; Metabolismo de aminoácidos	Depressão
Lin et al., 2017	60	Humano	Filo: Bacteroidetes ↑ Firmicutes ↓ Gênero: <i>Prevotella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Clostridium</i> ↑	Não mencionado	Depressão
Szyszkowicz et al., 2017	24	Ratos	Filo: Proteobacteria, Verrucomicrobia↑; Chloroflexi↓ Gênero: <i>Oscillospira</i> and <i>Turicibacter</i> ↓	Não mencionado	Depressão
Yang et al., 2017	12	Ratos	Filo: Actinobacteria↑; Tenericute↓ Gênero: <i>Butyricimonas</i> ↓	Não mencionado	Depressão
Yu et al., 2017	19	Ratos	Filo: Bacteroidetes↑; Firmicutes↓ Gênero: <i>Oscillibacter</i> ↑	Metabolismo de aminoácidos; Metabolismo de ácidos graxos; Metabolismo de ácido biliar	Depressão
Chen et al., 2018	20	Humano	Filo: Firmicutes, Actinobacteria, Lachnospiraceae↑; Bacteroidetes e Proteobacteria↓ Gênero: <i>Faecalibacterium</i> ↓	Metabolismo de glicose; Metabolismo de aminoácidos	Depressão
Huang et al., 2018	54	Humano	Filo: Proteobacteria↑; Firmicutes↓ Gênero: <i>Oxalobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Bulleidia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Gemella</i> ↑; <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Blautia</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Dorea</i> ↓	Não mencionado	Depressão
Skonieczna-Zydecka et al., 2018	116	Mulheres	Não mencionado	SCFA	Depressão
Stevens et al., 2018	50	Humano	Filo: Bacteroidetes ↑	Não mencionado	Ansiedade
Ma et al., 2019	20	Ratos	Gênero: <i>Oscillospira</i> , <i>Parabacteroides</i> , and <i>Aggregatibacter</i> ↑; <i>Phascolarctobacterium</i> , <i>Akkermansia</i> , <i>Ruminococcus</i> ↓	Metabolismo energético; Metabolismo de aminoácidos	Depressão
Jianguo et al., 2019	12	Ratos	Gênero: <i>Blautia</i> , <i>Helicobacter</i> ↑; <i>Lactobacillus</i> , <i>Porphyromonadaceae</i> ↓	Metabolismo de aminoácidos	Depressão
Chung et al., 2019	73	Humano	Filo: Firmicutes, Actinobacteria↑ Gênero: <i>Bifidobacterium</i> , <i>Blautia</i> ↑; <i>Prevotella</i> ↓	Não mencionado	Depressão
Rong et al., 2019	61	Humano	Filo: Firmicutes, Actinobacteria↑; Bacteroidete↓ Gênero: <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Oscillibacter</i> , <i>Streptococcus</i> ↑	Não mencionado	Depressão
McGaughey et al., 2019	39	Camundongos	Gênero: <i>Ruminococcus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Akkermansia</i> ↓	Não mencionado	Depressão
Tillmann et al., 2019	48	Ratos	Filo: Proteobacteria↑; Elusimicrobia and Saccharibacteria↓ Gênero: <i>Blautia</i> , <i>Subdoligranulum</i> ↑; <i>Candidatus Saccharimonas</i> , <i>Alistipe</i> , <i>Roseburia</i> ↓	Não mencionado	Depressão

Fonte: Tabela adaptada de Li et al, 2020.

2. JUSTIFICATIVA

A cada ano que passa os transtornos mentais acometem cada vez mais a população mundial, a pandemia do SARS-CoV-2 também trouxe novas consequências no que diz respeito à saúde mental. No Brasil, a região Sul chama atenção pelo alto índice de prevalência de doenças mentais. Desta forma, entender a forma como essa doença se relaciona com a microbiota pode trazer novas perspectivas, e elucidar como a doença age no organismo do indivíduo. Futuros tratamentos podem se beneficiar deste conhecimento e garantir uma melhor prática clínica, resultando em maior benefício para a população.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um perfil de abundância de táxons e vias metabólicas do MB de indivíduos controle e acometidos com depressão e ansiedade na população brasileira.

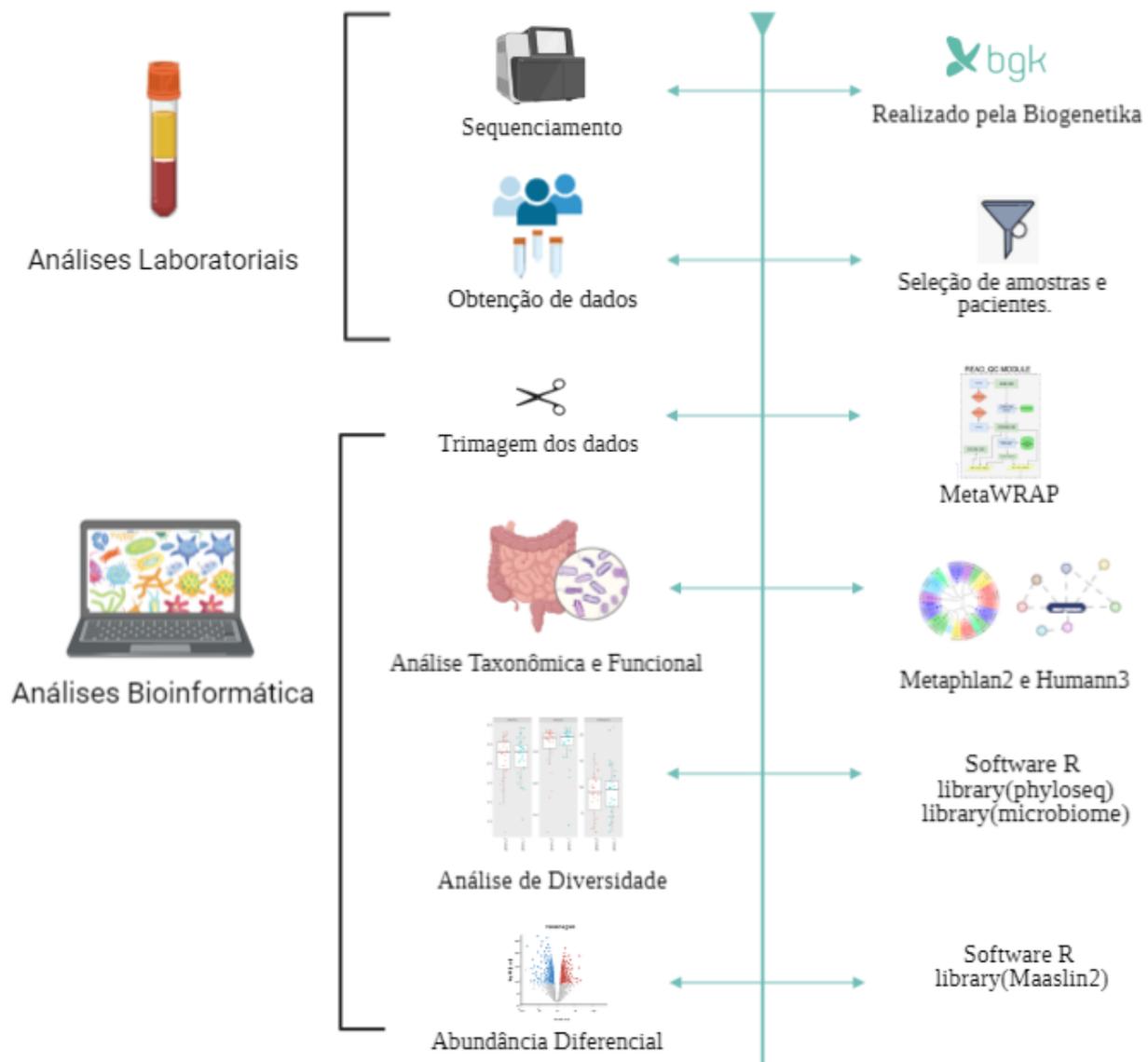
3.2 Objetivo específicos

- Definir padrões de abundância da microbiota em nível de espécie e gênero para indivíduos controles, com depressão e ansiedade;
- Inferir padrões de abundância diferencial para táxons, genes e vias metabólicas;
- Relacionar vias e genes com o fenótipo de diagnóstico de depressão e ansiedade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de metodologia

Figura 4. Fluxograma da metodologia resumindo os passos realizados na presente pesquisa.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

4.2 Dados de sequenciamento de amostras biológicas

As amostras selecionadas para o procedimento de sequenciamento *shotgun* foram disponibilizadas em formato fastq pelo laboratório Biogenetika, localizado na cidade de Florianópolis-SC, que comercializa testes de DNA e MBI. A escolha dos pacientes se deu através dos questionários pré-coleta preenchidos pelos mesmos (Anexo 2.1) nos quais foram selecionadas duas características:

- 1- Pacientes sem diagnóstico de nenhuma doença e nenhum sintoma.
- 2- Pacientes que marcaram que possuíam diagnóstico de depressão e/ou ansiedade .

Ao final da seleção o N amostral total resultou em 58 amostras de MB fecal, sendo destas 29 amostras de indivíduos com diagnóstico de depressão e/ou ansiedade e 29 amostras de indivíduos controle/saudáveis. Para análise as amostras foram separadas em três grupos:

CON - grupo de pacientes saudáveis, sem sintomas e sem diagnóstico de nenhuma doença.

T_DEP - pacientes diagnosticados com transtorno depressivo e sem diagnóstico de transtorno de ansiedade.

T_DEP_ANS - pacientes diagnosticados com transtorno depressivo e com diagnóstico de transtorno de ansiedade.

4.3 Análises de Bioinformática

4.3.1 Tratamento dos dados, Análise Taxonômica e Funcional

Para essas etapas foram utilizadas ferramentas do bioBakery3 e o software MetaWRAP (URITSKIY, G.v.,2018). Biobakery3 é uma coleção de diferentes ferramentas computacionais que permitem realizar de controle de qualidade a análise taxonômica e funcional(BEGHINI, F. et al, 2020).

Após o sequenciamento das amostras, os arquivos fastq passaram por um pré-processamento que consiste em verificar a qualidade do procedimento e a presença de leituras contaminantes, nesse caso, dados provenientes de DNA humano. Para esse processo foi utilizado o módulo Read_QC do MetaWRAP. Este destina-se a pré-processar leituras brutas de sequenciamento Illumina. As leituras foram cortadas levando em conta o conteúdo dos adaptadores e as notas PHRED de cada base, pontuado com a configuração padrão de

Trim-galore (-q Phred:20 --phred33 ON). Em seguida, as leituras foram alinhadas ao genoma do hospedeiro, nesse caso o genoma da espécie humana (genoma humano versão Hg38) com o módulo BMTagger (ROTMISTROVSKY, K; AGARWALA, R., 2011), para remover contaminação. Os pares de leitura em que apenas uma leitura (leituras órfãs) foi alinhada ao genoma do hospedeiro também foram removidos. Após, o FASTQC (ANDREWS, S. 2010) foi utilizado para avaliar a qualidade dos conjuntos de leitura bruta e final (URITSKIY, G.,2018).

Para análise taxonômica, o programa Metaphlan (Metagenomic Phylogenetic Analysis) foi utilizado (BEGHINI, F. et al, 2020). O Metaphlan traça o perfil de composição das comunidades microbianas, especificamente de dados de sequenciamento *shotgun*. Para isso ele utiliza marcadores específicos de clado, e cerca de ~ 1,1 milhões de genes marcadores específicos armazenados no banco de dados CHOCOPhlan (BEGHINI, F. et al, 2020). Além das configurações padrões foram utilizados os parâmetros adicionais: --add_viruses e --biom -t.

A análise funcional foi realizada pelo Humann3 (BEGHINI, F. et al, 2020), que é um método para traçar o perfil e abundância de vias metabólicas microbianas, além de outras funções moleculares a partir de dados de sequenciamento metagenômico. Para isso foram utilizados os parâmetros adicionais --taxonomic-profile, --tax_lev a e --add_viruses (BEGHINI, F. et al, 2020).

4.3.2 Análise de Abundância Diferencial de táxons e vias

Após o tratamento dos dados e análise taxonômica e funcional, foi realizada uma etapa de abundância diferencial de táxons. Foram verificadas as diferenças nas abundâncias entre o grupo controle e o grupo com DEP. Essa etapa foi realizada pelo pacote MaAsLin2 (MALLICK, H. et al, 2021), disponível no consórcio Biocondutor . O pacote MaAsLin2 faz parte do grupo de ferramentas da biobakery3 e é utilizado para determinar a associação multivariável entre fenótipos, ambientes, exposições, covariáveis e características metagenômicas microbianas.

A comparação realizada foi CON versus T_DEP e CON versus T_DEP_ANS. Para abundância diferencial de táxons, não foi utilizado nenhum método de normalização visto que os resultados já estão normalizados em abundância relativa. Para os genes e as vias metabólicas, o método de normalização TMM (*Trimmed Mean of M-values*) foi adotado,

removendo os que não obtiveram classificação. O algoritmo utilizado na análise de expressão diferencial de todos os grupos foi o CPLM (Compound Poisson). Táxons, genes e vias com $p.value < 0.05$ foram considerados significativos quanto à abundância diferencial.

Genes encontrados foram anotados nos bancos *Gene Ontology* (categorias: Processos Biológicos e Funções Moleculares), *Kegg Orthology* e Pfam (ASHBURNER et al., 20005; KANEHISA et al., 2016; MISTRY et al., 2021) Para as vias metabólicas, a anotação funcional foi baseada no banco Metacyc (CASPI et al., 2014).

4.3.3 Análise de diversidade alfa, beta e índice de saúde

A análise de diversidade alfa foi realizada a nível de espécie através do pacote de R phyloseq (HOLMES; P., 2013) através da função estimate_richness. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar as diferenças de diversidade entre os grupos. Para diversidade beta foi utilizada a função ordinate() do mesmo pacote, com os parâmetros method="PCoA", distance=dist_bray.

4.3.4 Testes estatísticos

As diferenças entre médias foram testadas utilizando o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov.

4.3.5 Visualização de dados

Para visualização gráfica foi utilizado o pacote R ggplot2 (WICKHAM, 2011), e o pacote Python matplotlib (HUNTER, 2007).

5. RESULTADOS

5.1 Análise exploratória dos dados

5.1.1 Dados Gerais sobre os pacientes

Foram analisados o total de 58 pacientes, sendo destes 16 pacientes acometidos apenas com DEP, 13 acometidos com DEP e ANS e 29 indivíduos controles. Nos três grupos foi encontrada uma predominância do sexo feminino (Tabela). Especialmente nos grupos T_DEP e T_DEP_ANS esse percentual foi bem superior, 87,5% e 84,6% de pacientes do sexo feminino respectivamente (Anexo 3.1)

Tabela 3 Metadados dos pacientes. Na coluna Amostra e Grupo a identificação individual de cada amostra e a qual grupo ela pertence. Na coluna idade e coluna Categoria Idade as idades dos pacientes na data da coleta. A coluna sexo apresenta o sexo de cada paciente, sendo F sexo feminino e M masculino. A coluna UF informa de qual estado o paciente é oriundo sendo que valores vazios são referente a questionários que não apresentavam a identificação. A coluna Doença diagnosticada refere-se a todas as doenças que o paciente informou ter o diagnóstico no dia da coleta. A coluna sintomas relatos referem-se a sintomas diversos relatados pelos pacientes. A coluna Mês da Coleta refere-se a data em que foi realizada a coleta da amostra.

Amostra	Grupo	Idade	Categoria de		Sexo	UF	Doença Diagnosticada	Sintomas Relatados	Mês da Coleta
			Idade						
CON_1	CON	32	De 31 até 35 anos		F	SC	-	-	fev./19
CON_10	CON	40	De 36 até 40 anos		F	SC	-	-	fev./20
CON_11	CON	76	Acima de 61 anos		F	SC	-	-	fev./20
CON_12	CON	51	De 51 até 55 anos		F	SP	-	-	mai./20
CON_13	CON	72	Acima de 61 anos		F	RJ	-	-	out./20
CON_14	CON	59	De 56 até 60 anos		M	SP	-	-	nov./20
CON_15	CON	70	Acima de 61 anos		F	SP	-	-	nov./20
CON_16	CON	67	Acima de 61 anos		F	SP	-	-	nov./20
CON_17	CON	34	De 31 até 35 anos		M	SC	-	-	nov./20
CON_18	CON	8	Até 18 anos		F	SP	-	-	nov./20
CON_19	CON	52	De 51 até 55 anos		F	RJ	-	-	dez./20
CON_2	CON	39	De 36 até 40 anos		M	RJ	-	-	mar./19
CON_20	CON	29	De 26 até 30 anos		M	RJ	-	-	dez./20
CON_21	CON	38	De 36 até 40 anos		M	SE	-	-	dez./20
CON_22	CON	63	Acima de 61 anos		F	RJ	-	-	dez./20
CON_23	CON	38	De 36 até 40 anos		M	RJ	-	-	fev./21
CON_24	CON	3	Até 18 anos		M	RJ	-	-	fev./21

Amostra	Grupo	Idade	Categoria de		UF	Doença Diagnosticada	Sintomas Relatados	Mês da Coleta
			Idade	Sexo				
CON_25	CON	43	De 41 até 45 anos	F	RJ	-	-	mar./21
CON_26	CON	44	De 41 até 45 anos	M	SC	-	-	mar./21
CON_27	CON	39	De 36 até 40 anos	F	SC	-	-	mar./21
CON_28	CON	44	De 41 até 45 anos	F	RJ	-	-	mar./21
CON_29	CON	52	De 51 até 55 anos	F	RJ	-	-	mar./21
CON_3	CON	65	Acima de 61 anos	M	SC	-	-	mar./19
CON_4	CON	43	De 41 até 45 anos	F	SP	-	-	ago./19
CON_5	CON	54	De 51 até 55 anos	M	-	-	-	ago./19
CON_6	CON	60	De 56 até 60 anos	F	PE	-	-	out./19
CON_7	CON	54	De 51 até 55 anos	M	RJ	-	-	nov./19
CON_8	CON	40	De 36 até 40 anos	F	SC	-	-	jan./20
CON_9	CON	36	De 36 até 40 anos	F	G O	-	-	jan./20
T_DEP_1	T_DEP	34	De 31 até 35 anos	F	SC	Câncer, Depressão	-	mai./20
T_DEP_10	T_DEP	42	De 41 até 45 anos	F	SP	Intolerância a lactose, Depressão, Alergia	Distensão abdominal, Flatulência, Constipação	fev./21
T_DEP_11	T_DEP	42	De 41 até 45 anos	F	RJ	Depressão	Constipação	mar./21
T_DEP_12	T_DEP	12	Até 18 anos	F	SP	Intolerância a lactose, Depressão	Náusea, Dor abdominal, Distensão abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência	mar./21
T_DEP_13	T_DEP	47	De 46 até 50 anos	F	-	Síndrome do intestino irritável, Depressão, Alergia	Distensão abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência, Constipação	mar./21
T_DEP_14	T_DEP	28	De 26 até 30 anos	M	SP	Doença inflamatória intestinal, Depressão, Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade	Dor abdominal, Constipação	mai./21

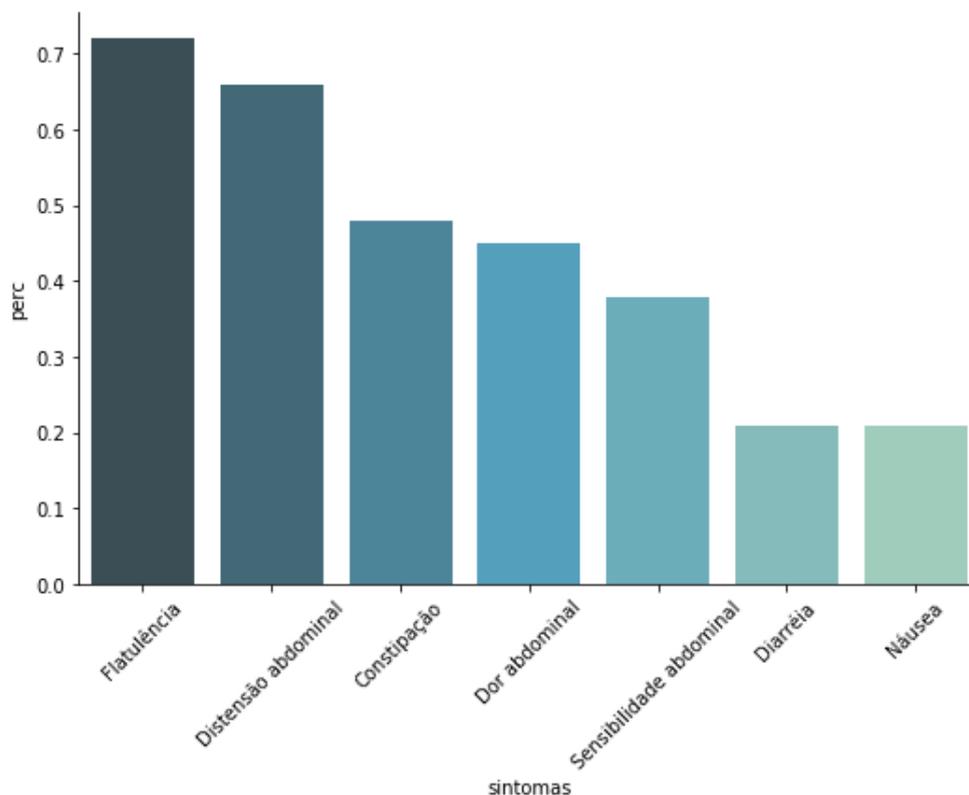
Amostra	Grupo	Idade	Categoria de		Sexo	UF	Doença Diagnosticada	Sintomas Relatados	Mês da Coleta
			Idade						
T_DEP_15	T_DEP	39	De 36 até 40 anos		F	SP	Síndrome do intestino irritável, Depressão	Náusea, Dor abdominal, Distensão abdominal, Diarreia, Sensibilidade abdominal, Flatulência, Constipação	mai./21
T_DEP_16	T_DEP	63	Acima de 61 anos		F	M G	Depressão	Distensão abdominal, Flatulência, Constipação	mai./21
T_DEP_2	T_DEP	48	De 46 até 50 anos		M	RJ	Síndrome do intestino irritável, Doença inflamatória intestinal, Colíte Ulcerativa, Dispepsia, Intolerância a lactose, Depressão, Alergia	Dor abdominal, Distensão abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência, Constipação	mai./20
T_DEP_3	T_DEP	72	Acima de 61 anos		F	RJ	Síndrome do intestino irritável, Intolerância a lactose, Depressão	Diarreia, Constipação	mai./20
T_DEP_5	T_DEP	37	De 36 até 40 anos		F	RS	Doença celíaca, Intolerância a lactose, Depressão, Alergia	Náusea, Flatulência	ago./20
T_DEP_6	T_DEP	46	De 46 até 50 anos		F	SP	Depressão	Constipação	out./20
T_DEP_7	T_DEP	41	De 41 até 45 anos		F	SP	Síndrome do intestino irritável, Doença inflamatória intestinal, Depressão, Alergia	Náusea, Dor abdominal, Distensão abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência	dez./20
T_DEP_8	T_DEP	38	De 36 até 40 anos		F	DF	Depressão, Alergia	-	dez./20
T_DEP_9	T_DEP	69	Acima de 61 anos		F	SC	Depressão, Asma, Alergia	Distensão abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência	dez./20
T_DEP_ANS_1	T_DEP_ANS	44	De 41 até 45 anos		F	SE	Câncer, Depressão, Transtorno de ansiedade	-	mai./20
T_DEP_ANS_10	T_DEP_ANS	33	De 31 até 35 anos		F	M G	Síndrome do intestino irritável, Intolerância a lactose, Depressão, Transtorno de ansiedade, Alergia	Náusea, Distensão abdominal, Flatulência, Constipação	dez./20
T_DEP_ANS_11	T_DEP_ANS	39	De 36 até 40 anos		F	RS	Depressão, Transtorno de ansiedade	Dor abdominal, Distensão abdominal, Diarreia, Sensibilidade abdominal, Flatulência, Constipação	fev./21
T_DEP_ANS_12	T_DEP_ANS	58	De 56 até 60 anos		F	A M	Doença inflamatória intestinal, Depressão, Transtorno de ansiedade	Distensão abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência, Constipação	mar./21
T_DEP_ANS_13	T_DEP_ANS	33	De 31 até 35 anos		F	PR	Depressão, Transtorno de ansiedade	Dor abdominal, Distensão abdominal, Flatulência	mar./21
T_DEP_ANS_2	T_DEP_ANS	25	De 19 até 25 anos		F	-	Intolerância a lactose, Depressão, Transtorno de ansiedade	Flatulência	mai./20

Amostra	Grupo	Idade	Categoria de Idade	Sexo	UF	Doença Diagnosticada	Sintomas Relatados	Mês da Coleta
T_DEP_ANS_3	T_DEP_ANS	35	De 31 até 35 anos	F	SP	Síndrome do intestino irritável, Doença inflamatória intestinal, Dispepsia, Depressão, Transtorno de ansiedade, Alergia	Dor abdominal, Distensão abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência, Constipação	mai./20
T_DEP_ANS_4	T_DEP_ANS	37	De 36 até 40 anos	F	SC	Intolerância a lactose, Depressão, Transtorno de ansiedade	Dor abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência	mai./20
T_DEP_ANS_5	T_DEP_ANS	45	De 41 até 45 anos	M	SP	Doença celíaca, Depressão, Transtorno de ansiedade	Dor abdominal, Distensão abdominal, Sensibilidade abdominal, Flatulência	mai./20
T_DEP_ANS_6	T_DEP_ANS	29	De 26 até 30 anos	F	SP	Depressão, Transtorno de ansiedade	Distensão abdominal, Flatulência, Constipação	mai./20
T_DEP_ANS_7	T_DEP_ANS	38	De 36 até 40 anos	F	SP	Síndrome do intestino irritável, Depressão, Transtorno de ansiedade, Artrite Reumatoide, Osteoartrite	Dor abdominal, Distensão abdominal, Flatulência	jul./20
T_DEP_ANS_8	T_DEP_ANS	60	De 56 até 60 anos	F	RS	Síndrome do intestino irritável, Dispepsia, Depressão, Transtorno de ansiedade	Distensão abdominal, Diarreia, Flatulência	out./20
T_DEP_ANS_9	T_DEP_ANS	37	De 36 até 40 anos	M	RJ	Síndrome do intestino irritável, Doença inflamatória intestinal, Depressão, Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, Transtorno de ansiedade, Alergia	Náusea, Dor abdominal, Distensão abdominal, Diarreia	out./20

A média de idade do grupo CON foi de 46,37 anos, do grupo T_DEP de 43,47 e do grupo T_DEP _ANS de 43,43 anos, não apresentando diferença estatística (CON x T_DEP p.value: 0.55, CON x T_DEP_ANS p.value: 0.11). Em todos os grupos uma grande parcela dos pacientes encontra-se na idade de 31 até 45 anos.

Além de sintomas relacionados à DEP, os pacientes dos grupos T_DEP e T_DEP_ANS também relataram presença de outros sintomas. Destaca-se o sintoma Flatulência; sintoma do qual 72,4% dos pacientes relataram sentir. Outros sintomas como Distensão abdominal (65,5%), Constipação (48,3%) e Dor abdominal (44,8%) também foram relatados por grande parte dos pacientes (Figura 7).

Figura 5. Sintomas relatados. Gráfico de barras demonstrando o percentual dos pacientes que apresentaram outros sintomas além dos causados pela depressão e ansiedade. No eixo x os sintomas, no eixo y percentual de indivíduos que relataram a presença do sintoma.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

5.1.2 Número de táxons

O número de táxons encontrados em cada um dos ranks (Filo, Ordem, Classe, Família, Gênero e Espécie) não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Sendo que no geral os grupos de pacientes com DEP apresentaram um menor número de táxons identificados, exceto a nível de filo no qual o grupo T_DEP apresentou média superior aos demais grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Número médio de táxons encontrados em cada grupo. Na coluna um o grupo de análise sendo CON referente aos indivíduos controle, T_DEP aos indivíduos com transtorno depressivo e T_DEP_ANS aos indivíduos com transtorno depressivo e ansioso.

Grupo	Filo	Ordem	Classe	Família	Gênero	Espécie
CON	6.93	13.07	11.86	23.59	42.79	112.83
T_DEP	7.19	12.06	11.75	22.56	41.69	107.94
T_DEP_ANS	6.54	12.92	11.23	22.00	39.46	115.38

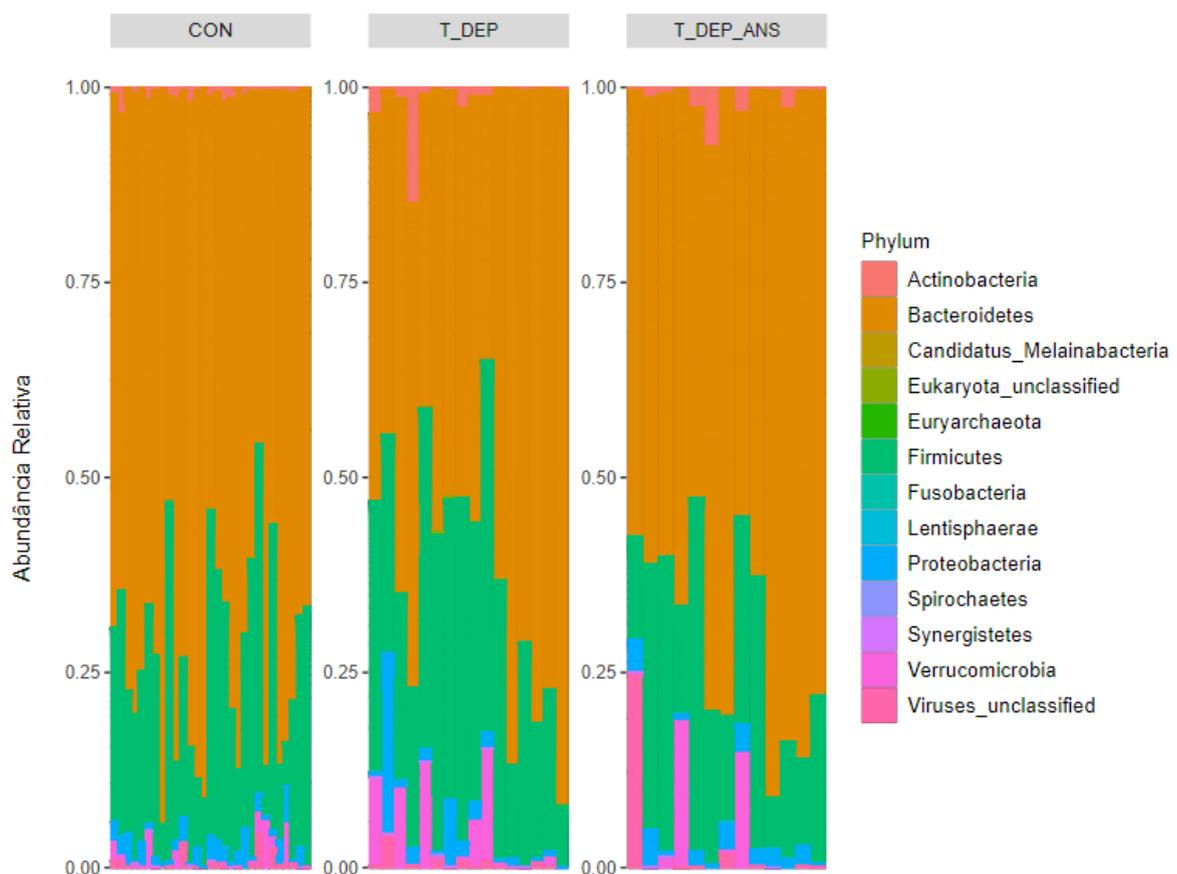
Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

5.2 Análise de taxonomia

Foram encontrados o total de 13 filios em cada grupo (Anexo 3.2), sendo que nos três grupos os filios predominantes foram os filios Bacteroidetes (CON: 72,7%, T_DEP: 61,1%, T_DEP_ANS:68,9%) e Firmicutes (CON: 23,2%, T_DEP: 30,0%, T_DEP_ANS: 22,5%) (Figuras 8). Em nível de gênero, foram encontrados 144 diferentes gêneros (Anexo 3.3). A predominância foi de *Bacteroides* (CON: 42,3%, T_DEP: 34,2%, T_DEP_ANS: 40,7%), *Prevotella* (CON: 13,1%, T_DEP: 12,2%, T_DEP_ANS: 15,9%) e *Alistipes* (CON: 9,7%, T_DEP: 8,3%, T_DEP_ANS: 6,7%). Em nível de espécie, foram encontradas 394 espécies (Anexo 3.4), e a ordem de abundância não seguiu a mesma ordem dentro dos grupos. Enquanto no grupo controle tivemos as espécies (*Prevotella copri* 12,1%, *Bacteroides vulgatus* 11,2 %, *Bacteroides uniformis* 9,0%, *Alistipes putredinis* 7,7%, *Bacteroides dorei* 6,4% e *Faecalibacterium prausnitzii* 6,2%) como as mais abundantes, no grupo de pacientes com DEP a ordem de abundância se alterou, mas se manteve nos táxons citados: (*Prevotella copri* 9,2%, *Bacteroides uniformis* 8,6%, *Bacteroides vulgatus* 7,1%, *Faecalibacterium prausnitzii* 5,7%, *Alistipes putredinis* 4,8%, *Bacteroides dorei* 4,5%), e no grupo de pacientes com ANS e DEP tivemos a maior prevalência de (*Prevotella copri* 11,2%, *Bacteroides*

uniformis 10,1%, *Bacteroides dorei* 6,9%, *Bacteroides stercoris* 6,5%, *Bacteroides vulgatus* 6,3% e *Faecalibacterium prausnitzii* 5,4%).

Figura 6. Abundância de filos por grupo. Gráfico de barras demonstrando a abundância relativa dos filos encontrados dentro de cada grupo. No eixo x as todas amostras analisadas em seus respectivos grupos, no eixo y abundância relativa de cada filo, as cores representam os filos encontrados e os grupos estão destacados na parte superior onde CON refere-se ao controle, T_DEP transtorno depressivo, T_DEP_ANS transtorno depressivo e ansiedade.



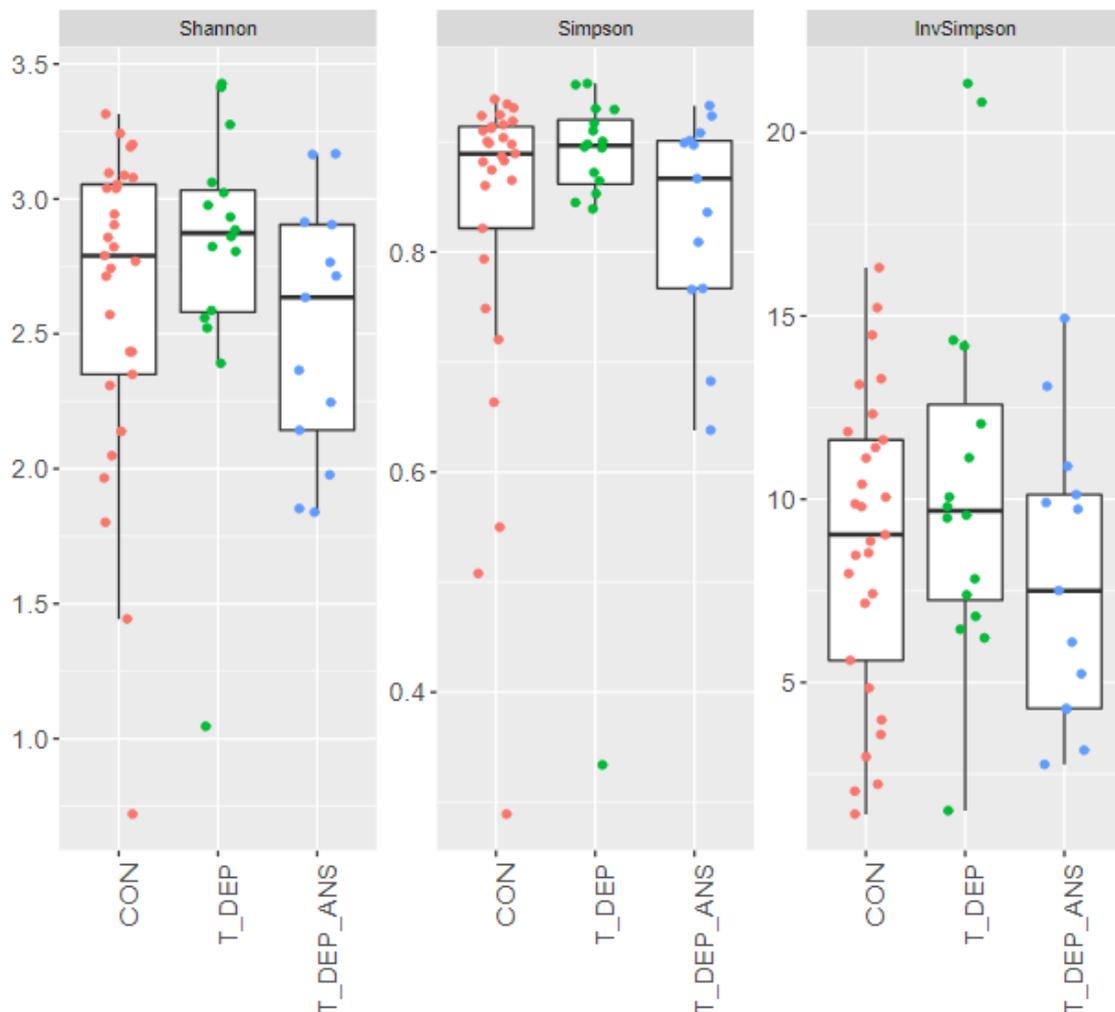
Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

5.3 Índice de diversidade

A diversidade alfa encontrada nos diferentes grupos não apresentou diferença estatística significativa. A média do índice de Shannon para o grupo CON foi de 2,79 enquanto para o grupo T_DEP foi de 2,87 e para o grupo T_DEP_ANS foi de 2,63 (Anexo

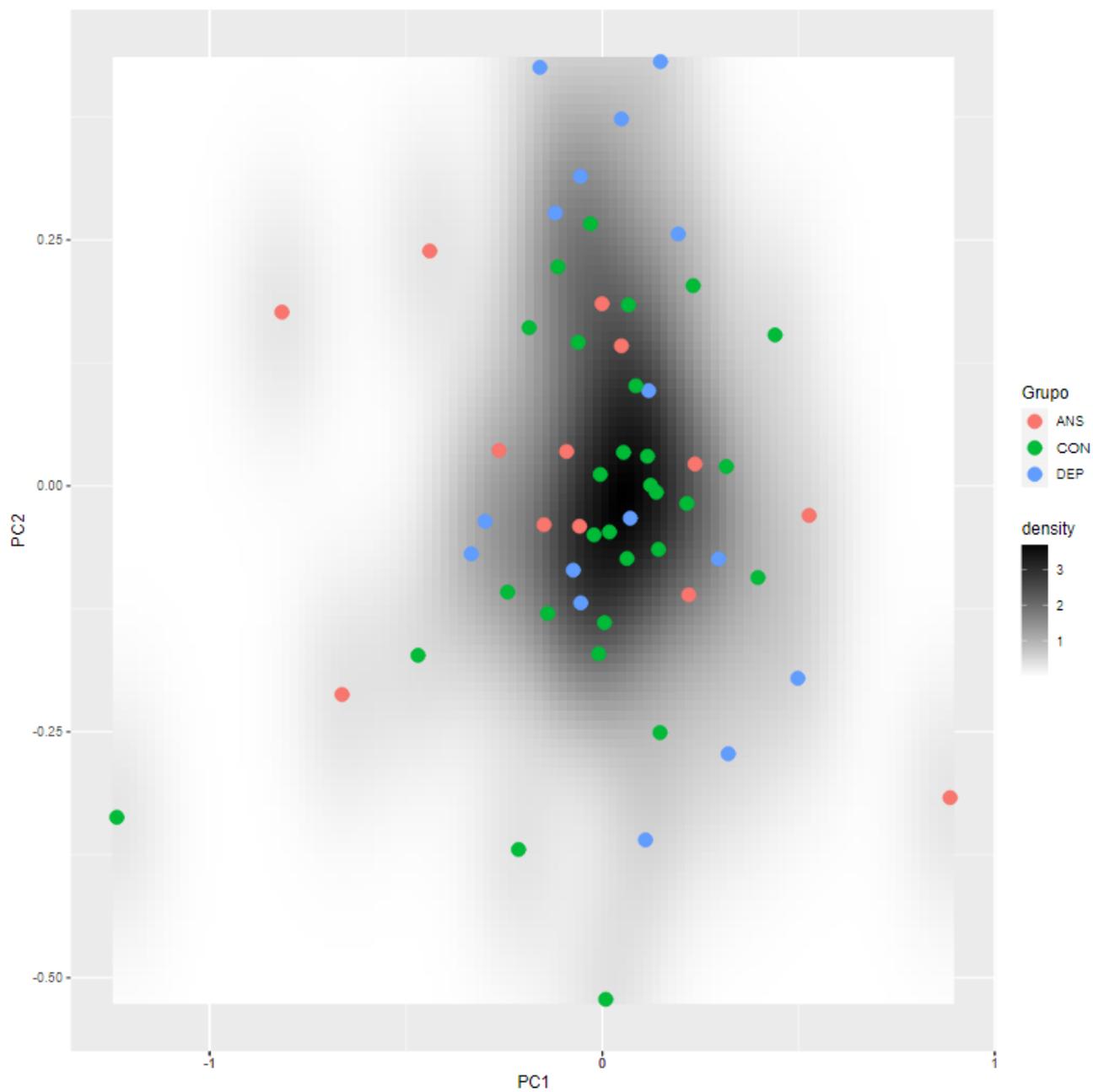
3.5 e Figura 10). O índice de Simpson teve média de 0,88 para o CON e 0,89 para o T_DEP e 0,86 para o grupo T_DEP_ANS. O índice invSimpson apresentou média de 9,03 CON, 9,68 T_DEP e 7,51 T_DEP_ANS.

Figura 7. Índices de diversidade. Gráfico boxplot demonstrando os índices de diversidade por amostra. No eixo x a diferenciação dos grupos onde CON refere-se ao controle, T_DEP transtorno depressivo, T_DEP_ANS transtorno depressivo e ansiedade, no eixo y os índices de diversidade.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Figura 8. PCOA. Gráfico de dispersão demonstrando a similaridade das amostras conforme componentes principais um e dois. No eixo x componente principal um, no eixo y componente principal dois, nas cores a representação de cada grupo. CON refere-se ao controle, T_DEP transtorno depressivo, T_DEP_ANS transtorno depressivo e ansiedade. A densidade demonstra onde há uma maior concentração de amostras.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

5.4 ABUNDÂNCIA DIFERENCIAL

5.4.1 Abundância Diferencial taxonômica

Na análise abundância diferencial realizada entre grupo CON versus T_DEP e CON versus grupo de T_DEP_ANS foram encontrados 95 táxons diferencialmente abundantes.

Sendo destes, 54 no grupo T_DEP e 41 no grupo T_DEP_ANS. Dos 95 táxons 74,7% estavam em abundância aumentada. Nos dois grupos, gênero e espécie foram os que mais apresentaram táxons diferencialmente abundantes.

Em nível de Filo apenas o grupo T_DEP apresentou táxons diferencialmente abundantes. O filo p__Bacteroidetes apresentou abundância reduzida (p.value: 0.01) e o filo p__Verrucomicrobia teve abundância aumentada (p.value: 0.03).

Em nível de gênero T_DEP teve 13 táxons diferencialmente abundantes sendo destes 12 com abundância aumentada e 1 com abundância reduzida (Tabela 5).

Tabela 5. Gêneros diferentemente abundantes no grupo T_DEP (indivíduos com depressão). Tabela de gêneros diferencialmente abundantes. Na coluna Gênero os gêneros encontrados em abundância diferencial, na coluna log2 o log2 do coeficiente da variação da abundância, na coluna p.value o valor do teste estatístico realizado pelo MaasLin2 e na coluna Abundância a situação do gênero na comparação.

Gênero	LOG2	p.value	Abundância
<i>g_Blautia</i>	1.07	0.001	Aumentada
<i>g_Anaerostipes</i>	1.90	0.002	Aumentada
<i>g_Anaeromassilibacillus</i>	4.44	0.004	Aumentada
<i>g_Citrobacter</i>	3.22	0.014	Aumentada
<i>g_Desulfovibrio</i>	2.89	0.018	Aumentada
<i>g_Akkermansia</i>	1.87	0.025	Aumentada
<i>g_Veillonella</i>	-4.67	0.029	Reduzida
<i>g_Ruminococcus</i>	1.29	0.030	Aumentada
<i>g_Butyrvibrio</i>	2.61	0.040	Aumentada
<i>g_Asaccharobacter</i>	2.62	0.035	Aumentada
<i>g_Anaerotignum</i>	2.61	0.039	Aumentada
<i>g_Ruminococcaceae_unclassified</i>	1.53	0.041	Aumentada
<i>g_Klebsiella</i>	2.65	0.044	Aumentada

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

O grupo T_DEP_ANS apresentou sete gêneros diferencialmente abundantes sendo destes cinco com abundância aumentada e dois com abundância reduzida (Tabela 7).

Tabela 6. Gêneros diferentemente abundantes no grupo T_DEP_ANS (indivíduos com depressão e ansiedade). Tabela de gêneros diferencialmente abundantes. Na coluna Gênero os gêneros encontrados em abundância diferencial, na coluna log2 o log2 do coeficiente da variação da abundância, na coluna p.value o valor do teste estatístico realizado pelo MaasLin2 e na coluna Abundância a situação do gênero na comparação.

Gênero	LOG2	p.value	Abundância
<i>g_Agathobaculum</i>	1.72	0.008	Aumentada
<i>g_Barnesiella</i>	-2.25	0.014	Reduzida
<i>g_Clostridium</i>	-2.49	0.016	Reduzida
<i>g_Viruses_unclassified</i>	3.18	0.022	Aumentada
<i>g_Bilophila</i>	1.22	0.028	Aumentada
<i>g_Turicimonas</i>	2.10	0.038	Aumentada
<i>g_Rothia</i>	2.40	0.043	Aumentada

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Em nível de espécie o grupo T_DEP teve 25 táxons diferencialmente abundantes, sendo 20 com abundância aumentada e cinco com abundância reduzida (Tabela 8).

Tabela 7. Espécies diferencialmente abundantes no grupo T_DEP (indivíduos com depressão). Tabela de espécies diferencialmente abundantes. Na coluna Espécies as espécies encontrados em abundância diferencial, na coluna log2 o log2 do coeficiente da variação da abundância, na coluna p.value o valor do teste estatístico realizado pelo MaasLin2 e na coluna Abundância a situação da espécie na comparação.

Espécie	LOG2	p.value	Abundância
<i>s_Collinsella_intestinalis</i>	7.45	0.000	Aumentada
<i>s_Clostridium_leptum</i>	11.24	0.000	Aumentada
<i>s_Eubacterium_ventriosum</i>	5.82	0.000	Aumentada
<i>s_Eubacterium_hallii</i>	3.38	0.002	Aumentada
<i>s_Anaerostipes_hadrus</i>	1.90	0.002	Aumentada
<i>s_Bifidobacterium_longum</i>	3.23	0.004	Aumentada
<i>s_Bacteroides_cellulosilyticus</i>	2.08	0.005	Aumentada
<i>s_Blautia_obeum</i>	2.17	0.005	Aumentada
<i>s_Firmicutes_bacterium_CAG_170</i>	3.76	0.004	Aumentada
<i>s_Bacteroides_intestinalis</i>	-4.74	0.007	Reduzida
<i>s_Klebsiella_pneumoniae</i>	3.76	0.007	Aumentada
<i>s_Flavonifractor_sp_An100</i>	4.38	0.014	Aumentada
<i>s_Eisenbergiella_massiliensis</i>	-4.88	0.014	Reduzida
<i>s_Bacteroides_plebeius</i>	3.31	0.015	Aumentada
<i>s_Streptococcus_salivarius</i>	-4.82	0.014	Reduzida
<i>s_Eubacterium_eligens</i>	1.75	0.021	Aumentada
<i>s_Akkermansia_muciniphila</i>	1.87	0.025	Aumentada
<i>s_Coproccoccus_comes</i>	-1.42	0.026	Reduzida
<i>s_Streptococcus_thermophilus</i>	2.89	0.034	Aumentada
<i>s_Anaerotignum_lactatifermentans</i>	2.61	0.039	Aumentada
<i>s_Asaccharobacter_celatus</i>	2.62	0.035	Aumentada
<i>s_Butyrvibrio_crossotus</i>	2.63	0.034	Aumentada
<i>s_Desulfovibrio_piger</i>	3.64	0.045	Aumentada
<i>s_Eubacterium_siraeum</i>	1.54	0.052	Aumentada

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Já o grupo T_DEP_ANS teve o total de 22 espécies sendo destas 14 em abundância aumentada e oito em abundância reduzida (Tabela 9).

Tabela 8. Espécies diferentemente abundantes no grupo T_DEP_ANS (indivíduos com depressão e ansiedade). Tabela de espécies diferencialmente abundantes. Na coluna Espécies as espécies encontrados em abundância diferencial, na coluna log2 o log2 do coeficiente da variação da abundância, na coluna p.value o valor do teste estatístico realizado pelo MaasLin2 e na coluna Abundância a situação da espécie na comparação.

Espécie	LOG2	p.value	Abundância
<i>s_Clostridium_leptum</i>	11.17	0.000	Aumentada
<i>s_Ruminococcaceae_bacterium_D16</i>	3.55	0.004	Aumentada
<i>s_Eubacterium_ventriosum</i>	4.50	0.005	Aumentada
<i>s_Clostridium_symbiosum</i>	3.79	0.007	Aumentada
<i>s_Agathobaculum_butyriciproducens</i>	1.72	0.008	Aumentada
<i>s_Parabacteroides_johnsonii</i>	-7.05	0.008	Reduzida
<i>s_Bacteroides_massiliensis</i>	-2.99	0.014	Reduzida
<i>s_Barnesiella_intestinihominis</i>	-2.25	0.014	Reduzida
<i>s_Paraprevotella_clara</i>	-4.76	0.015	Reduzida
<i>s_Bacteroides_clarus</i>	-4.42	0.020	Reduzida
<i>s_Bacteroides_fragilis</i>	2.45	0.022	Aumentada
<i>s_Bilophila_wadsworthia</i>	1.22	0.028	Aumentada
<i>s_Streptococcus_parasanguinis</i>	2.44	0.027	Aumentada
<i>s_Ruminococcus_obeum_CAG_39</i>	2.37	0.038	Aumentada
<i>s_Butyricimonas_synergistica</i>	-2.79	0.037	Reduzida
<i>s_Turicimonas_muris</i>	2.10	0.038	Aumentada
<i>s_Salmonella_phage_Fels_1</i>	2.95	0.039	Aumentada
<i>s_Rothia_mucilaginososa</i>	2.40	0.043	Aumentada
<i>s_Bacteroides_xylanisolvans</i>	-2.51	0.046	Reduzida
<i>s_Roseburia_faecis</i>	1.26	0.051	Aumentada
<i>s_Clostridium_aldenense</i>	3.02	0.053	Aumentada
<i>s_Ruminococcus_bicirculans</i>	-3.23	0.055	Reduzida

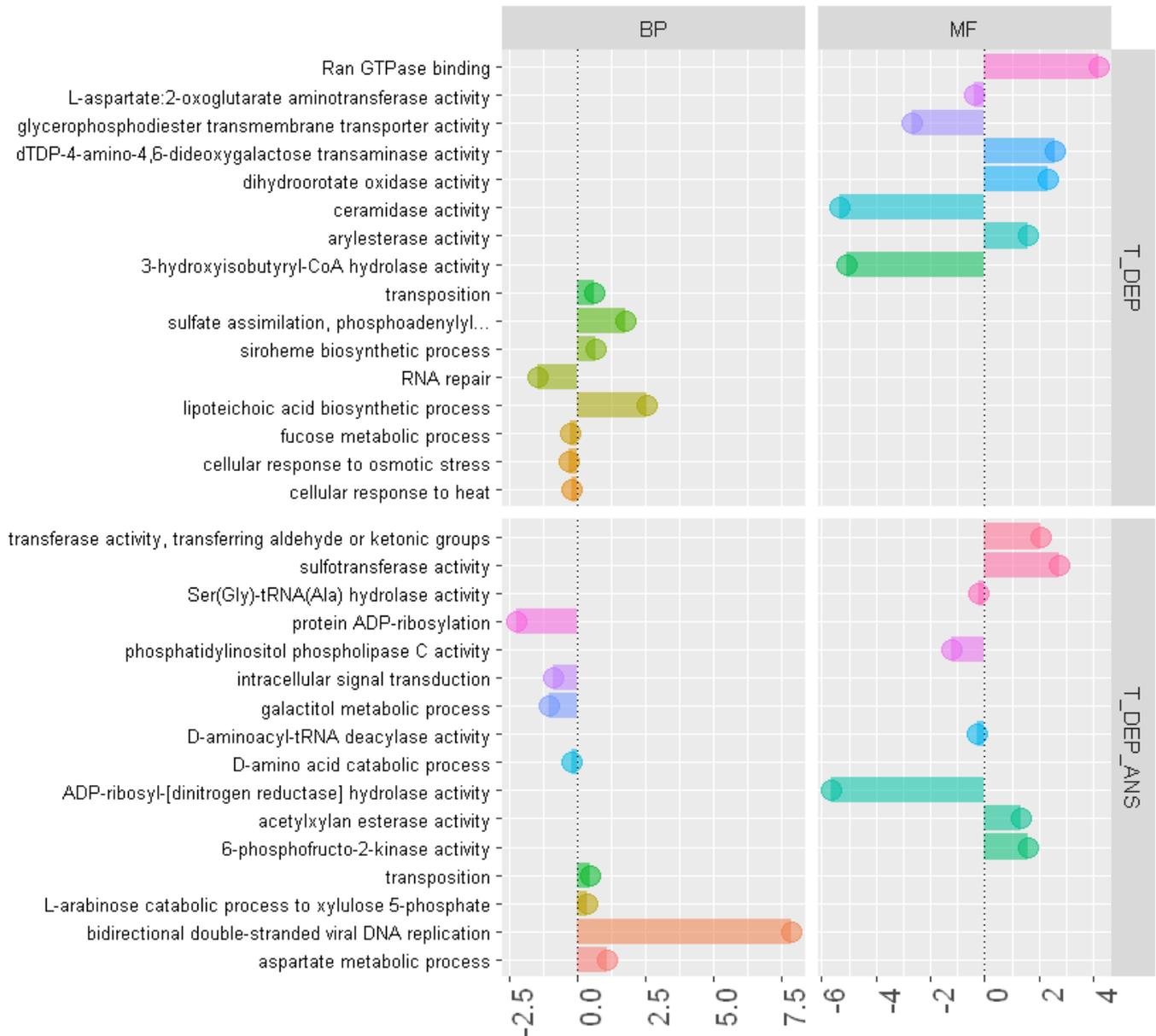
Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

5.4.2 Abundância diferencial de genes

Para a categoria *Gene Ontology* Processos Biológicos foram 130 processos diferencialmente abundantes sendo destes 78 para o grupo T_DEP e 52 para T_DEP_ANS

(Anexo 3.6 e Figura 12). Para a categoria *Gene Ontology* Funções Moleculares tivemos 284 termos diferencialmente abundantes, 195 no grupo T_DEP e 89 no grupo T_DEP_ANS.

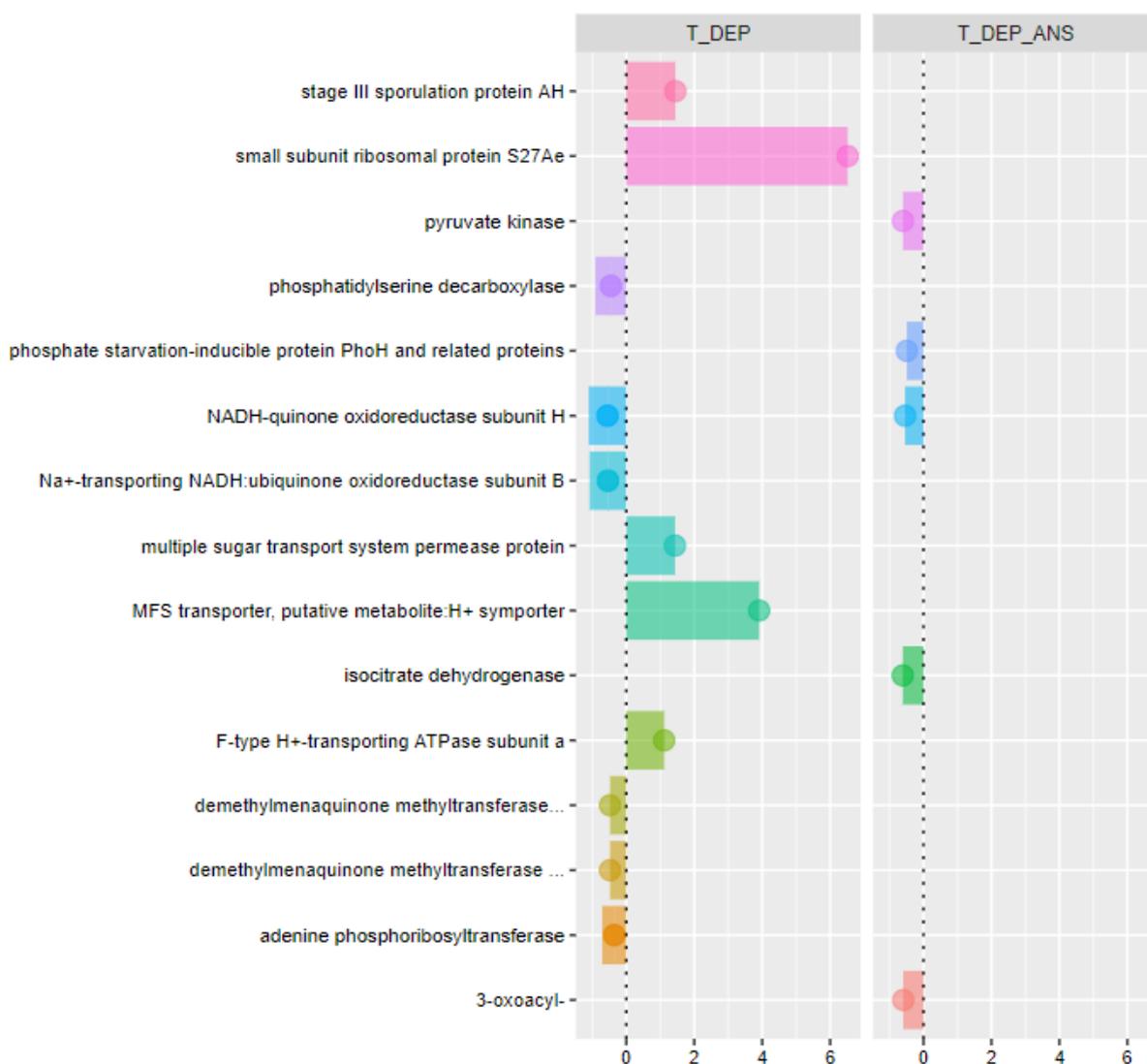
Figura 9. Processos biológicos (BP) e funções moleculares (MF) diferencialmente abundantes. Gráfico de barras demonstrando os processos biológicos e funções moleculares diferencialmente abundantes. No eixo x o log2 do coeficiente da variação da abundância, no eixo y os processos biológicos e moleculares. As colunas referem-se às categorias analisadas BP e MF.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Para a categoria *Kegg Orthology* tivemos 973 termos diferencialmente abundantes, 568 no grupo T_DEP e 405 no grupo T_DEP_ANS (Figura 13). Destes, 358 estavam em baixa abundância e 615 em alta abundância e 109 não possuem função conhecida.

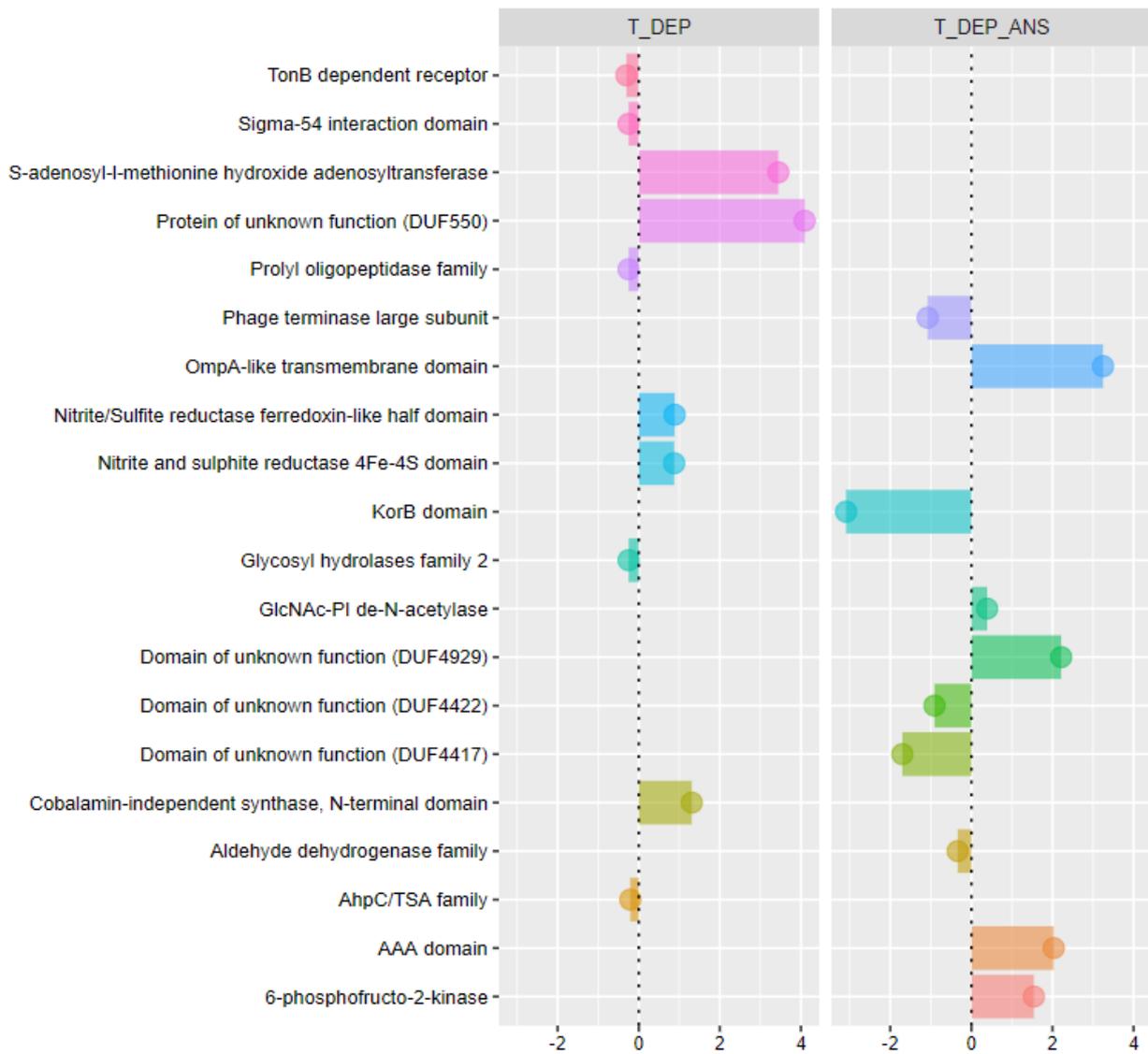
Figura 10. Termos do Kegg orthology diferencialmente abundantes. Gráfico de barras demonstrando os termos do kegg orthology diferencialmente abundantes. No eixo x o log2 do coeficiente de variação da abundância, no eixo y os termos do kegg orthology.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Para a categoria *pfam* tivemos 671 termos diferencialmente abundantes, 456 no grupo T_DEP e 215 no grupo T_DEP_ANS (Figura 14). Das 671 categorias encontradas diferencialmente abundantes 90 delas eram de função desconhecida.

Figura 11. Termos do pfam diferencialmente abundantes. Gráfico de barras demonstrando os termos do pfam diferencialmente abundantes. No eixo x o log2 do coeficiente de variação da abundância, no eixo y os termos do pfam.

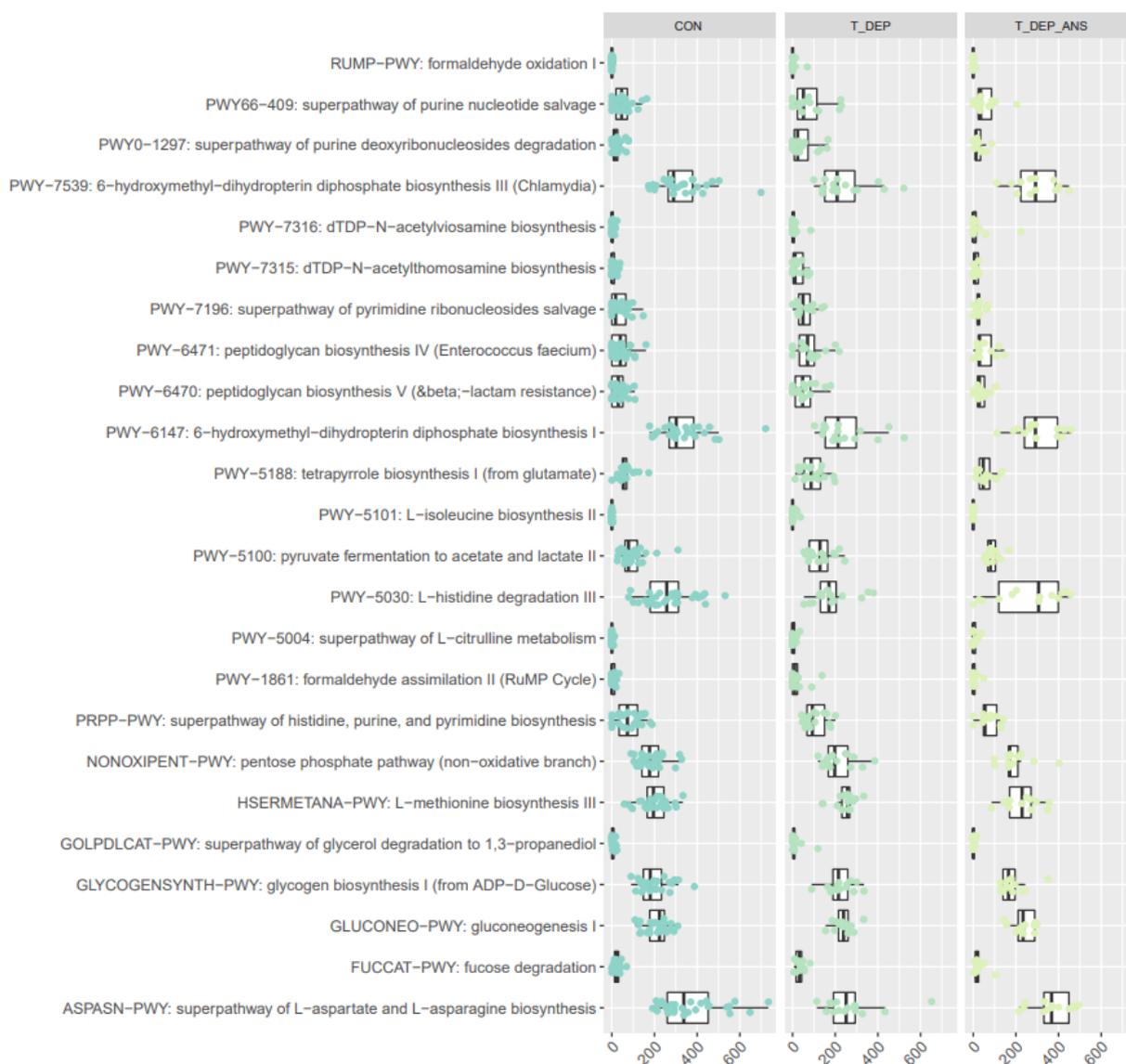


Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

5.4.3 Abundância diferencial de vias

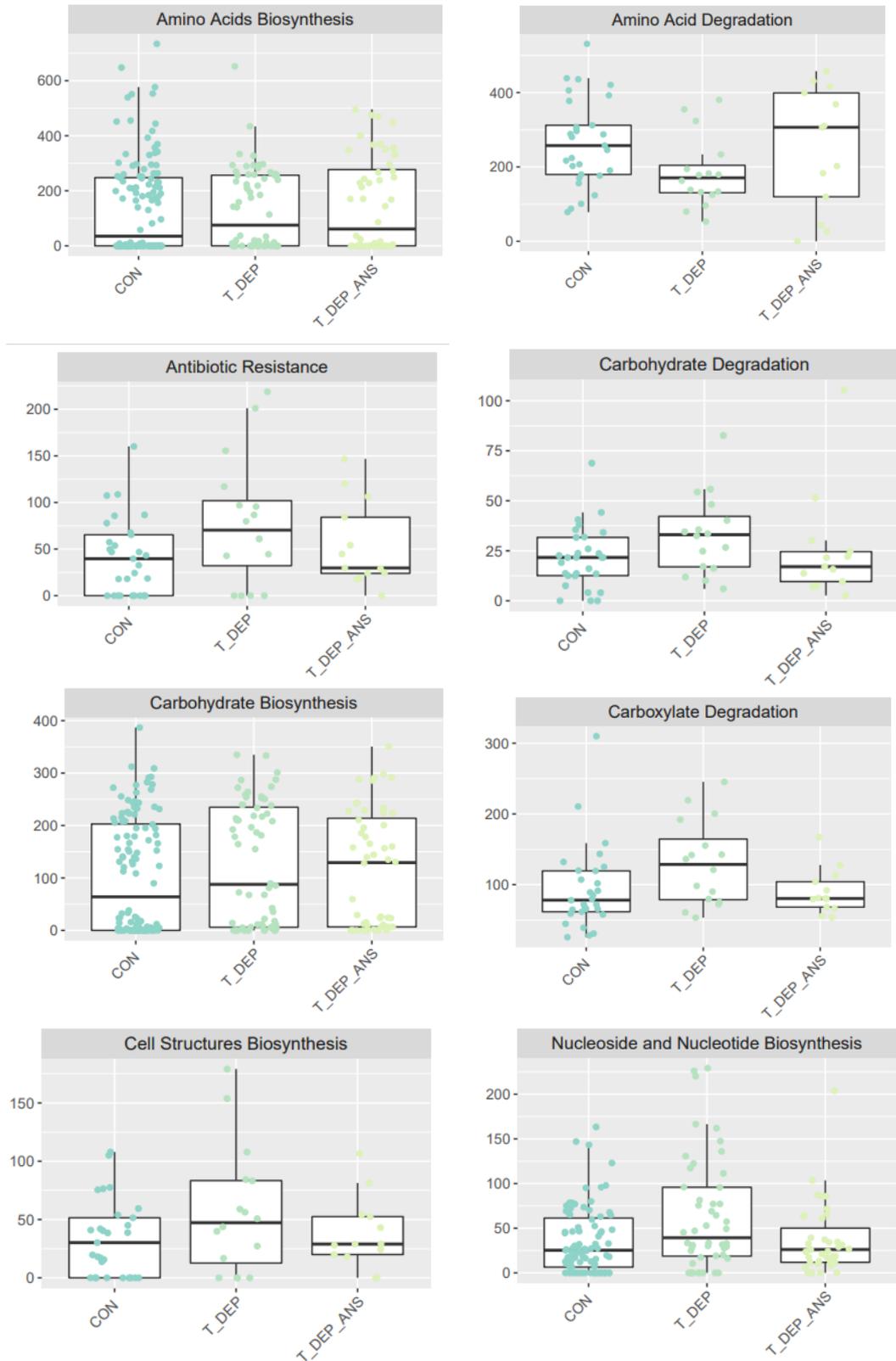
Foram encontradas 32 vias diferencialmente abundantes, 23 no grupo T_DEP e nove no grupo T_DEP_ANS (Anexo 3.10, Figura 15). Destas, 24 estavam em alta abundância e oito em baixa abundância. Das vias encontradas diferencialmente abundantes nos grupos T_DEP e T_DEP_ANS, 37,5% estavam relacionadas ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos (Figura 16).

Figura 12. Vias metabólicas diferentemente abundantes. Gráfico de boxplot demonstrando vias metabólicas diferentemente abundantes. No eixo x a abundância, no eixo y as vias metabólicas. Os pontos representam as amostras. Os boxplots representam a média e os quartis de abundância.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Figura 13. Abundância das categorias das vias metabólicas. Gráficos boxplot demonstrando abundância das categorias das vias metabólicas. No eixo x a abundância, no eixo y as vias metabólicas. Os pontos representam as amostras. Os boxplots representam a média e os quartis de abundância.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

6. DISCUSSÃO

6.1 Análise exploratória dos dados

Os pacientes analisados para o desenvolvimento da pesquisa eram predominantemente mulheres, mulheres têm quase duas vezes mais probabilidade de desenvolver transtorno depressivo do que os homens, e até quatro vezes mais probabilidade de desenvolver transtorno depressivo recorrente (SASSARINI, 2016; KUEHNER, 2017).

O número de táxons encontrados em cada um dos ranks (Filo, Ordem, Classe, Família, Gênero e Espécie), bem como os índices de diversidade alfa não apresentaram diferenças estatísticas significativas, o que já foi demonstrado em trabalhos anteriores: Naseribafrouei e colaboradores (2014) relataram que apesar de não encontrarem diferenças entre os números de OTUS em pacientes saudáveis e depressivos, pacientes com DEP apresentaram média superior em relação aos saudáveis. Esse achado é interessante e nos faz refletir se uma maior diversidade de microrganismos está de fato ligada a um paciente mais saudável, e se essa variável deve continuar sendo utilizada como parâmetro dentro do MBH, especialmente intestinal. Comumente, diferentes trabalhos citam a falta de resultados significativos entre diversidades alfas de diferentes grupos - saudável x controle. Inclusive algumas discussões apontam que a diversidade alfa não é a melhor ferramenta para se medir dados de MBI (GUPTA et al, 2020), visto que a microbiota é um sistema muito mais complexo e deve levar em contas variáveis como patogenicidade e funções de cada microrganismo, bem como seus respectivos genes ativos.

Conforme o que ficou evidente nas análises de diversidade alfa; a análise de diversidade beta também demonstrou uma heterogeneidade nas amostras dos diferentes grupos conforme gráfico PCOA (Figura 11), demonstrando que em nível geral os grupos não apresentam características que os colocariam em clusters específicos conforme seus respectivos grupos.

6.2 Análise de taxonomia

6.2.1 Perfil dos pacientes controle

Dentre os filos com maior abundância dentro do MBI, temos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia (THE MICROSETTA INITIATIVE, 2021). Os filos Firmicutes e Bacteroidetes representam cerca de 90% da microbiota intestinal (Figura 17). Nos três grupos, os filos predominantes foram o

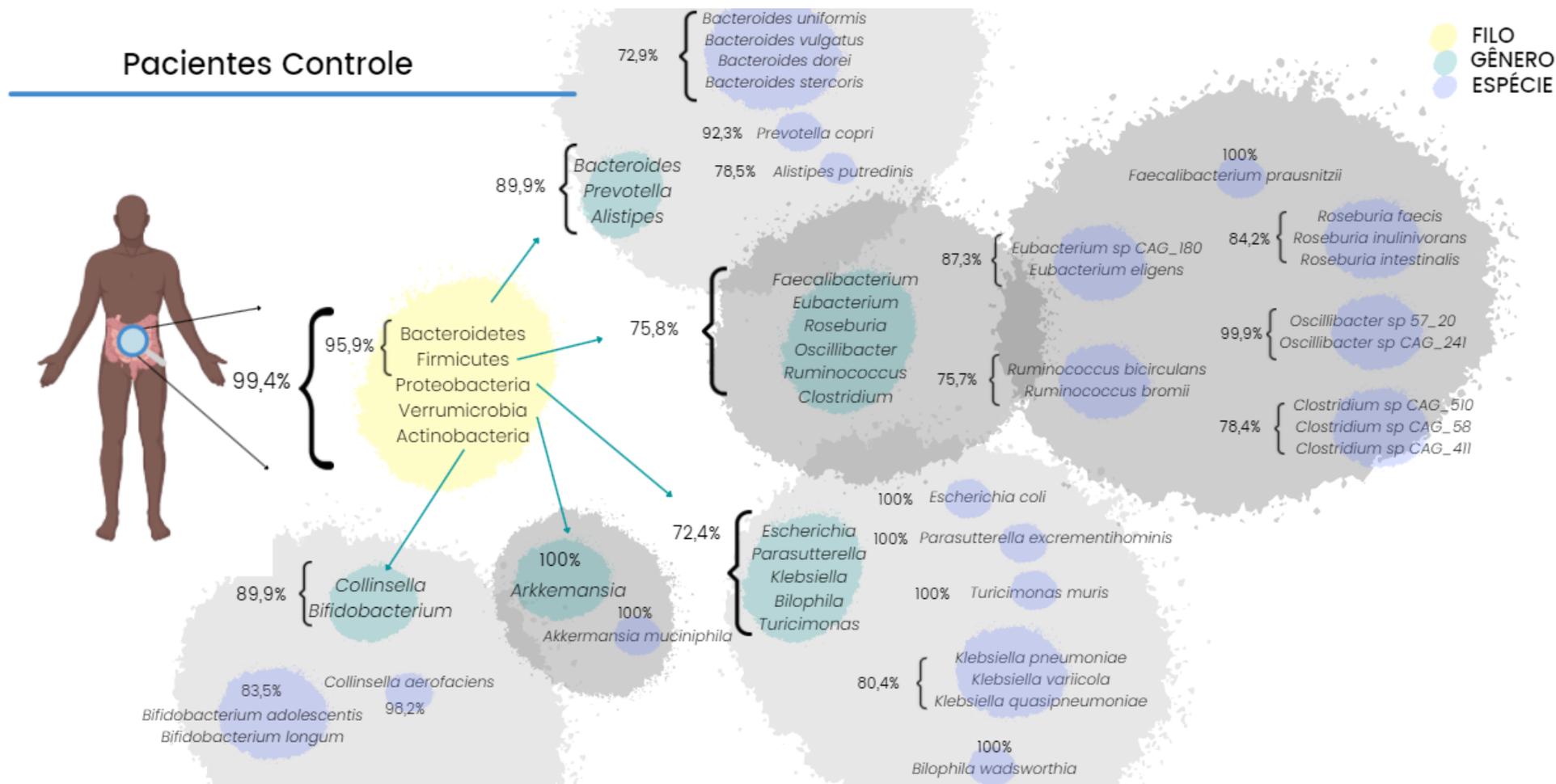
Bacteroidetes e o Firmicutes, representando mais de 90% da abundância identificada nos três grupos, seguidos por Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria e Viruses_unclassified.

Em nível de gênero, *Bacteroides* e *Prevotella* foram os mais abundantes dentro dos três grupos, seguidos por *Alistipes*, *Faecalibacterium* e *Parabacteroides*. O gênero *Bacteroides*, pertencente ao filo Bacteroidetes, é altamente predominante no intestino humano. Esse gênero desempenha um papel importante tanto na manutenção como também na estabilidade de um ecossistema intestinal saudável (ARON; WEXLER; GOODMAN, 2020).

Yoshida e colaboradores (2020), demonstraram que o gênero *Bacteroides* pode ter papel importante e benéfico na progressão de doenças cardiovasculares. Os autores destacam que os lipopolissacarídeos (LPS) fecais derivados da microbiota intestinal, possuem impacto clínico em pacientes acometidos com síndrome do intestino irritável, doença autoimune e doenças cardiovasculares. Ainda, a abundância do gênero *Bacteroides* está significativa e negativamente correlacionada com os níveis de LPS fecais (YOSHIDA et al., 2020). Esse gênero também foi correlacionado com dietas com alto teor de gordura e proteínas, o que é uma característica de países ocidentais.

O gênero *Prevotella* é comumente encontrado em indivíduos que possuem uma dieta rica em fibras e vegetais (TETT et al., 2019 ; HANSEN et al., 2017). Espécies desse gênero estão associadas à produção de propionato, que possui papel importante na prevenção do ganho de peso, reduzindo o colesterol sérico e diminuindo a lipogênese hepática (DEN BESTEN, 2013). Diferentes espécies do gênero *Prevotella* podem contribuir para acentuar o metabolismo da glicose estimulado pela ingestão de prebióticos (KOVATCHEVA-DATCHARY, 2015).

Figura 14. Ilustração da composição da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis da população Brasileira representada neste estudo. Em amarelo os filios, em verde os gêneros e em roxo as espécies. Foram destacadas na ilustração apenas os táxons mais abundantes.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

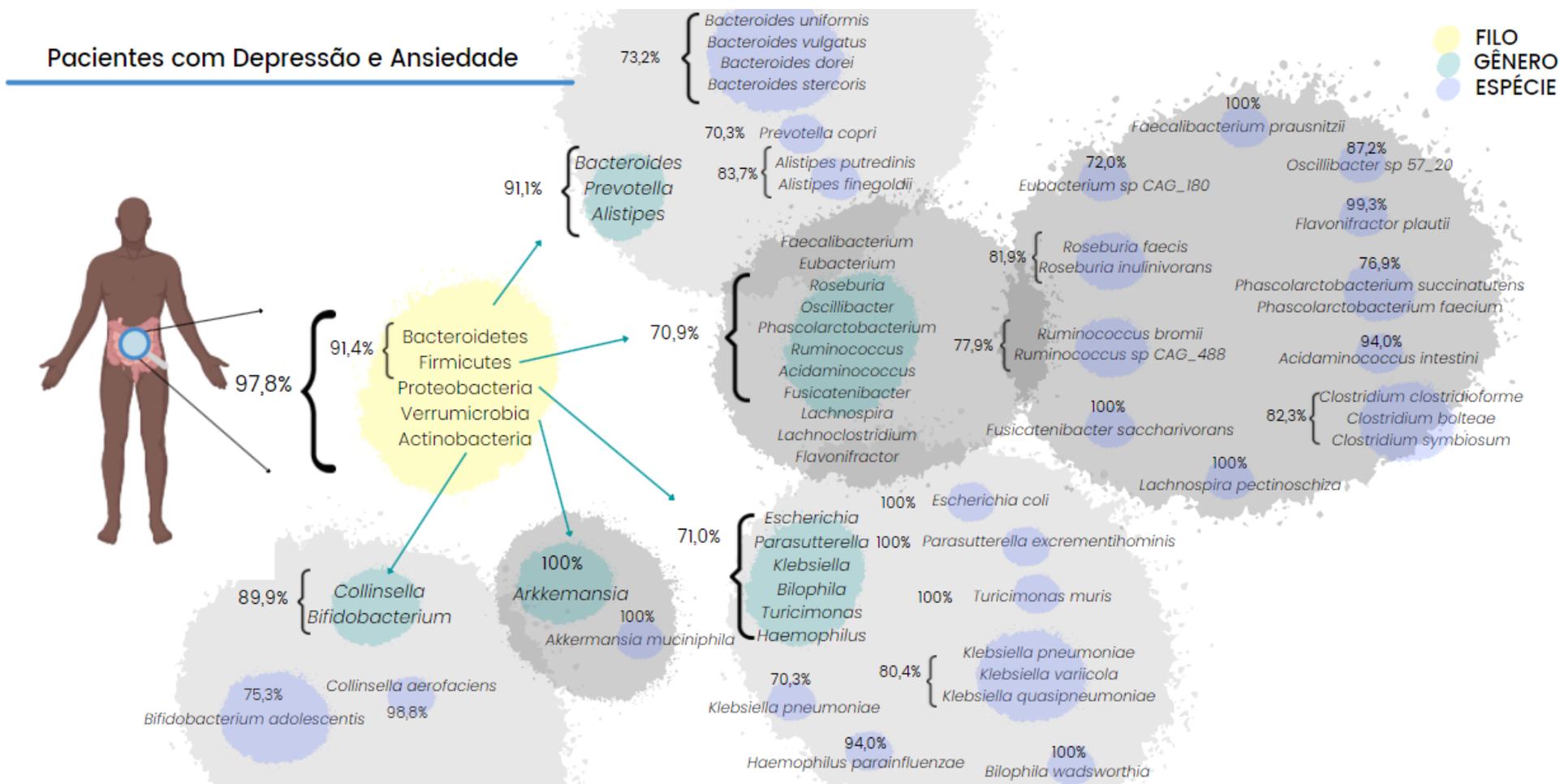
6.2.1 Perfil dos pacientes acometidos com depressão e depressão/ ansiedade

Nos pacientes do grupo T_DEP e T_DEP_ANS, os filos Firmicutes e Bacteroidetes também representaram cerca de 90% da microbiota intestinal (Figura 18 e 19). No grupo T_DEP, Bacteroidetes estava em menor abundância comparado aos demais grupos (CON 72,7%, T_DEP 61,1% e T_DEP_ANS 68,9%).

Em nível de gênero, *Bacteroides* e *Prevotella* também foram os mais abundantes, seguidos por *Alistipes*, *Faecalibacterium* e *Parabacteroides* no grupo T_DEP_ANS, e *Alistipes*, *Eubacterium* e *Faecalibacterium* no grupo T_DEP. Curiosamente o gênero *Prevotella* estava em maior abundância no grupo T_DEP_ANS quando comparado aos demais (CON 13,1%, T_DEP 12,3% e T_DEP_ANS 16,0%). Essa diferença é significativa? Apesar de possuir diversos fatores positivos e probióticos, alguns estudos apontaram que algumas espécies e cepas específicas podem contribuir para distúrbios inflamatórios, devido a interação de algumas espécies com o sistema imunológico, liberando mediadores inflamatórios de células imunes e estromais (LARSEM et al., 2017). Algumas pesquisas também correlacionaram positivamente os níveis de *Prevotella* com obesidade, diabetes tipo 2 e Doença Esteatótica Não Alcoólica do Fígado (MICHAIL et al., 2015). Os distúrbios inflamatórios como Síndrome do Intestino Irritável (SII) possuem co-ocorrência com DEP e ANS estimada entre 44%- 84% (CARRA et al., 2020). Dos 13 pacientes do grupo T_DEP_ANS, doze apresentaram diagnóstico ou sintomas relacionados a inflamações intestinais (Figura 8). Lin e colaboradores (2017) apontaram uma redução do filo Bacteroidetes e aumento dos gêneros *Prevotella*, *Klebsiella*, *Streptococcus* e *Clostridium* em pacientes com transtorno depressivo maior.

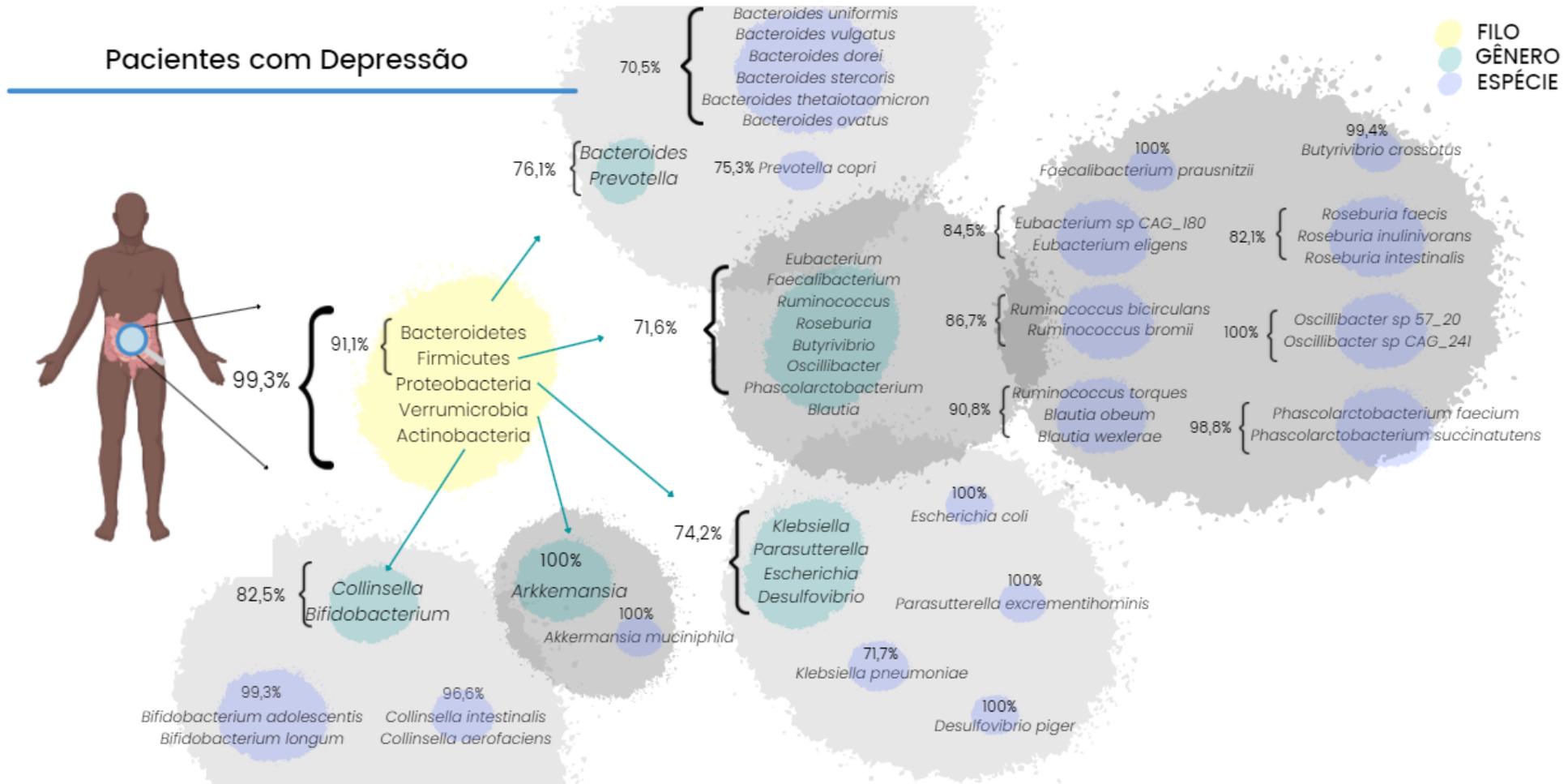
O gênero *Faecalibacterium* apareceu levemente reduzido em pacientes com DEP e DEP/ANS (CON 6,2%, T_DEP 5,7%, T_DEP_ANS 5,4%). Esse gênero possui espécies capazes de produzir butirato. Os SCFAs desempenham um papel crítico na proteção da mucosa intestinal, regulando a resposta imune inata e sistemática e melhorando a motilidade gastrointestinal (VENKATARAMAN et al., 2016; RIOS-COVIAN et al., 2016).

Figura 15. Ilustração da composição da microbiota intestinal de indivíduos acometidos com depressão e ansiedade da população Brasileira. Em amarelo os filios, em verde os gêneros e em roxo as espécies. Foram destacadas na ilustração os táxons mais abundantes.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Figura 16. Ilustração da composição da microbiota intestinal de indivíduos acometidos com depressão da população Brasileira. Em amarelo os filos, em verde os gêneros e em roxo as espécies. Foram destacadas na ilustração os táxons mais abundantes.



Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022)

6.3 ABUNDÂNCIA DIFERENCIAL

6.3.1 Abundância diferencial taxonômica

6.3.1.1 Concordância com a literatura

Na análise abundância diferencial nossos resultados corroboram estudos anteriores demonstrando que pacientes com DEP apresentam o filo Bacteroidetes reduzido. Apesar de muitos estudos já terem relato esse fato, (NASERIBAFROUEI et al., 2014; ZHENG et al., 2016; CHEN et al., 2018; RONG et al. 2019), algumas pesquisas demonstraram o oposto: Jian e colaboradores em 2015, Yang e colaboradores em 2017 e Stevens e colaboradores em 2018 observaram uma abundância aumentada do filo Bacteroidetes. Desta forma ainda não há um consenso e possivelmente outros fatores influenciam a abundância desse filo. O filo Verrucomicrobia encontrado em abundância aumentada em pacientes com DEP também já havia sido relatado anteriormente (SZYSKOWICZ et al., 2017).

Em nível de família Clostridiaceae apresentou baixa abundância no grupo T_DEP_ANS corroborando o achado de Huang e colaboradores (2018), porém, o estudo de Huang apontou essa baixa abundância para pacientes apenas com DEP e na nossa pesquisa pacientes apenas com DEP não tiveram alteração nessa família. Nossa hipótese é que possivelmente a família Clostridiaceae esteja associada a sintomas relacionados à ansiedade. Muitas vezes o diagnóstico de ansiedade não é feito em um primeiro momento ou até se desenvolve posteriormente.

O gênero *Blautia* encontrado em abundância aumentada em pacientes com DEP foi relatado em estudos anteriores (TILMANN et al., 2019; CHUNG et al., 2019). O neurotransmissor microbiano intestinal GABA é um produto do metabolismo da arginina que é dependente de *Blautia*. (ZUANG et al., 2020).

Percebemos que no geral ainda não há um consenso geral em nível de táxons diferencialmente abundantes em pacientes com DEP/ANS, levantando novamente a importância que outros fatores podem exercer na abundância da MBI além do acometimento da doença. Levantar esses fatores em consideração é de suma importância para que o entendimento da relação entre DEP e ANS com a MBI seja o mais completo possível.

6.3.1.2 Táxons modificadores de SFCA's

Dentre os filos, Bacteroidetes, diferencialmente abundante no grupo T_DEP - em redução -, possui participação na produção de Butirato, assim como o gênero *Clostridium* e a espécie *Ruminococcus bicirculans* (VENEGAS et al., 2020) que apresentaram redução no grupo T_DEP_ANS . SCFAs são importantes para manter a barreira e integridade intestinal, e alterações na sua produção podem prejudicar a resposta imunológica (MORRIS et al., 2017) e alterar a estabilidade do eixo HPA.

Em nível de espécie, curiosamente, as espécies *Collinsella intestinalis* e *Clostridium leptum*, bactérias modificadoras de SFCA (KABEERDOSS et al., 2013) apresentaram alta abundância nos dois grupos. Visto que o filo Bacteroidetes e o gênero *Clostridium* estão associados ao SFCA e estão em baixa abundância, é possível que de alguma forma algumas espécies específicas tentem compensar a falta de SFCA. Por outro lado, outras espécies modificadoras de SFCA e/ou triptofano como *Streptococcus salivarius*, estavam em baixa abundância no grupo T_DEP.

6.6.1.3 Táxons relacionados com neurotransmissores

Uma das formas que a microbiota pode interagir com o sistema nervoso é através da metabolização de neurotransmissores. *Bacteroides spp.* estão envolvidos na produção de metabólitos relevantes para a DEP, como o GABA (OTARU t. al, 2021). Diferentes estudos apontam para uma associação entre DEP e déficits GABAérgicos, isso poderia explicar a baixa abundância do filo Bacteroidetes no grupo T_DEP. Algumas espécies associadas a produção de GABA como *Streptococcus salivarius*, *Coprococcus comes*, também estavam em abundância reduzida no grupo T_DEP.

No grupo T_DEP_ANS as espécies *Clostridium leptum*, *Clostridium symbiosum* estavam significativamente em maior abundância. Dopamina em excesso pode causar sintomas de mania, euforia, comportamentos compulsivos, muito observados em transtornos de ANS e alguns transtornos DEP (VOLKOW et al., 2011; AYANO, 2016). Ainda nesse ponto, curiosamente a espécie *Akkermansia muciniphila* pertencente ao filo Verrucomicrobia participa de metabolização de serotonina e foi encontrada em abundância aumentada no grupo T_DEP (YAGHUBFAR, 2020, DING et al., 2021). Além disso, o gênero *Blautia*, encontrado em abundância aumentada em pacientes com DEP, também participa na metabolização do GABA. Esse resultado já foi observado em outros estudos (ZHUANG et al., 2020, TILMAN

et al, 2019), e sugere que esse gênero pode participar na progressão da DEP de diferentes maneiras, inclusive de forma negativa.

6.3.2 Abundância diferencial de genes e vias metabólicas

6.3.2.1 Aspartato

Dentro da abundância diferencial de genes no grupo T_DEP observamos uma redução em genes envolvidos com o processo biossintético de aminoácidos da família aspartato. Esses aminoácidos podem ter uma possível função de neurotransmissor excitatório no cérebro (DINGLELINE ; 1997, KARIN; et. al, 2015). Lu e colaboradores (2014) em uma pesquisa realizada com pacientes depressivos evidenciou que ao comparados com pacientes saudáveis, pacientes com DEP apresentaram redução nos níveis plasmáticos de aspartato.

Em contrapartida, no grupo T_DEP_ANS o processo metabólico de aspartato estava em alta abundância (GO GO:0006531: [BP] aspartate metabolic process).

6.3.2.2 Ciclo da uréia

Um dos achados curiosos diz respeito a via PWY-498: ciclo da ureia. Pesquisas anteriores relataram que pacientes com alterações no ciclo da ureia apresentaram quadros depressivos (TAZAWA, 2013; ALLEN, 2013). Essa via apresentou redução nos dois grupos, porém apenas no T_DEP_ANS ela foi estatisticamente significativa.

6.3.2.3 Metabolismo de Aminoácidos e Carboidratos

Pacientes com DEP apresentaram alterações em diferentes vias relacionadas com metabolismo de carboidratos/aminoácidos e relacionadas com energia (abundância aumentada FUCCAT-PWY: degradação da fucose, GLYCOGENSYNTH-PWY: biossíntese de glicogênio I, HSERMETANA-PWY: biossíntese de L-metionina; abundância reduzida BIOTIN-BIOSYNTHESIS-PWY: biossíntese de biotina I). O equilíbrio energético desempenha um papel essencial no funcionamento biológico normal, e o eixo HPA participa na regulação de diferentes sistemas, incluindo o sistema metabólico. Alterações no metabolismo do açúcar e no metabolismo energético podem ser resultado de distúrbios no eixo HPA (HERMAN et. al, 2016). Essas alterações podem influenciar diretamente na

manifestação de sintomas e comportamentos depressivos. Diferentes pesquisas também relataram que indivíduos com DEP apresentaram alterações de abundância em bactérias envolvidas com metabolismo de aminoácidos e de carboidratos. Zheng e colaboradores (2016), em um estudo realizado com camundongos, demonstraram que camundongos com sintomas depressivos apresentaram a maioria das vias metabólicas de carboidratos aprimoradas em relação ao controle, sugerindo uma maior demanda de energia em camundongos deprimidos. O transplante da microbiota fecal de camundongos com comportamentos depressivos em camundongos saudáveis resultou em comportamentos semelhantes à DEP e disbiose, bem como distúrbios de metabólitos do hospedeiro, especialmente no metabolismo de carboidratos e aminoácidos (ZHENG et al., 2016). Chen e colaboradores (2018), em um estudo realizado em humanos, também demonstraram alterações em vias relacionadas ao metabolismo de aminoácido e energia em indivíduos com DEP. Os metabólitos derivados de aminoácidos têm sido considerados moduladores importantes na patogênese da dor crônica e da DEP.

6.3.2.4 Resistência a antibiótico

Nos dois grupos, T_DEP e T_DEP_ANS, a via PWY-6471: peptidoglycan biosynthesis IV (*Enterococcus faecium*) apresentou abundância aumentada, sendo significativa somente no grupo T_DEP. Essa é uma importante via relacionada com a resistência a antibióticos. O peptidoglicano, principal componente da parede celular bacteriana, tem sido utilizado nas últimas décadas na descoberta de antibacterianos (NIKOLAIDIS et al., 2014). A síntese do peptidoglicano ocorre sequencialmente em três compartimentos celulares (citoplasma, membrana e periplasma) e foram identificados inibidores de proteínas que catalisam cada estágio, embora nem todos sejam aplicáveis para uso clínico. Porém, vários desses antimicrobianos tornaram-se inativos por mecanismos de resistência (NIKOLAIDIS et al., 2014). Mesmo assim, os antibióticos que inibem a biossíntese de peptidoglicanos bacterianos são os mais amplamente utilizados na prática clínica atual (SANTISO et al., 2011). Alguns estudos sugerem que medicamentos antidepressivos como a Fluoxetina podem contribuir para um aumento na resistência a antibióticos (JIN et al., 2018).

7. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Ao final da pesquisa, com os resultados obtidos, podemos concluir:

- O perfil da microbiota dos pacientes brasileiros controle analisados na presente amostra é composta majoritariamente por Bacteroidetes e Firmicutes a nível de filo, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Eubacterium* e *Roseburia* em nível de gênero;
- O perfil da microbiota dos pacientes brasileiros acometidos por DEP e DEP/ANS é composta majoritariamente por Bacteroidetes e Firmicutes a nível de filo, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Eubacterium* e *Akkermansia* em nível de gênero;
- Pacientes brasileiros analisados na amostra com DEP apresentam alterações na microbiota condizentes com estudos já apresentados na literatura, mas diferentes aspectos ainda não relatados também foram encontrados e precisam ser estudados para melhor entendimento das suas implicações;
- Pacientes com DEP e DEP/ANS apresentaram alterações significativas na abundância de táxons relacionados a metabolização de SFCA's e neurotransmissores;
- Pacientes com DEP, apresentaram alterações em diferentes vias relacionadas com metabolismo de carboidratos/aminoácidos e relacionadas com energia: em abundância aumentada;

Ao término dessa pesquisa e com os resultados obtidos, podemos concluir que a depressão e ansiedade podem causar diversas alterações na microbiota intestinal do hospedeiro. Alterações essas, que podem estar impactando o sistema imunológico afetando o indivíduo não só de uma maneira psíquica mas também física. Fica evidente também que a forma que essas alterações ocorrem no organismo ainda é complexa e influenciada por diversos fatores o que sugere que cada vez mais estudos dentro dessa área devam ser realizados. Foi possível inferir que pacientes brasileiros, da amostra analisada, com depressão apresentam alterações na microbiota condizentes com estudos já apresentados na literatura mas, diferentes aspectos ainda não relatados também foram encontrados. Visto que o Brasil se

encontra no topo dos países com maior índice de DEP e ANS se faz necessário aprofundar os achados dessa pesquisa.

8. LIMITAÇÕES E FATORES DE IMPACTO

Essa pesquisa foi desenvolvida a partir de amostras de pacientes que não foram entrevistados pelo autor da pesquisa, o que pode influenciar nos resultados. Informações, consideradas importantes pelo autor e citadas abaixo não foram coletadas e podem contribuir para um melhor delineamento do estudo:

- A depressão está estabilizada ou está em momento de crise?
 - A quanto tempo sofre com depressão?
 - O paciente realmente teve o diagnóstico de depressão ou acha que tem depressão?
- Visto que o questionário pré-coleta é de autopreenchimento, não tivemos como confirmar o diagnóstico.

Ainda, os pacientes dos grupos T_DEP e T_DEP_ANS relataram tomar medicamentos, sabemos que isso afeta a composição da microbiota. Mesmo assim, os resultados obtidos são relevantes e corroboram achados importantes da literatura a respeito do eixo intestino-cérebro e a depressão.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A GILBERT, Jack; BLASER, Martin J; CAPORASO, J Gregory; JANSSON, Janet K; LYNCH, Susan V; KNIGHT, Rob. Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 392-400, abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4517>

ALLEN, Shari N.. Urea cycle disorder. *Mental Health Clinician*, [S.L.], v. 2, n. 12, p. 398-401, 1 jun. 2013. College of Psychiatric and Neurologic Pharmacists (CPNP). <http://dx.doi.org/10.9740/mhc.n155467>.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), 5ª edição. 2013. Disponível em: [http://repository.poltekkes-kaltim.ac.id/657/1/Diagnostic%20and%20statistical%20manual%20of%20mental%20disorders%20-%20DSM-5%20\(%20PDFDrive.com%20\).pdf](http://repository.poltekkes-kaltim.ac.id/657/1/Diagnostic%20and%20statistical%20manual%20of%20mental%20disorders%20-%20DSM-5%20(%20PDFDrive.com%20).pdf)

AMON, Protima; SANDERSON, Ian. What is the microbiome? **Archives Of Disease In Childhood - Education & Practice Edition**, [S.L.], v. 102, n. 5, p. 257-260, 28 fev. 2017. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2016-311643.x>.

ANDREWS S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

APA GUIDE TO 2016 ANNUAL MEETING. 166th. San Francisco: **American Psychiatric Association**; 2013. Disponível em: https://www.psychiatry.org/File%20Library/Psychiatrists/Directories/Library-and-Archive/conference_publications/am_program_2013.pdf

ASHBURNER, Michael; BALL, Catherine A.; BLAKE, Judith A.; BOTSTEIN, David; BUTLER, Heather; CHERRY, J. Michael; DAVIS, Allan P.; DOLINSKI, Kara; DWIGHT, Selina S.; EPPIG, Janan T. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 25-29, maio 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/75556>.

AVERINA, Olga V.; ZORKINA, Yana A.; YUNES, Roman A.; KOVTUN, Alexey S.; USHAKOVA, Valeriya M.; MOROZOVA, Anna Y.; KOSTYUK, George P.; DANILENKO, Valery N.; CHEKHONIN, Vladimir P. Bacterial Metabolites of Human Gut Microbiota Correlating with Depression. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 23, p. 9234, 3 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21239234>.

AYANO, Getinet. Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders. *Journal Of Mental Disorders And Treatment*, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 0-0, 2016. **OMICS Publishing Group**. <http://dx.doi.org/10.4172/2471-271x.1000120>.

BEATY, T.H.; MURRAY, J.C. MARAZITA, M.L.; MUNGER, R.G.; KIRKE, P.N.; SCOTT, J.M.; ARCOS-BRUGOS, M.; Scott, A.F. 2010. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. **Nature Genetics**, In press.

BEGHINI, Francesco; MCIVER, Lauren J; BLANCO-MÍGUEZ, Aitor; DUBOIS, Leonard; ASNICAR, Francesco; MAHARJAN, Sagun; MAILYAN, Ana; MANGHI, Paolo; SCHOLZ, Matthias; THOMAS, Andrew Maltez. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. **Elife**, [S.L.], v. 10, 4 maio 2021. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.65088>.

BELCHEVA, Antoaneta; IRRAZABAL, Thergiory; ROBERTSON, Susan J.; STREUTKER, Catherine; MAUGHAN, Heather; RUBINO, Stephen; MORIYAMA, Eduardo H.; COPELAND, Julia K.; SURENDRA, Anu; KUMAR, Sachin. Gut Microbial Metabolism Drives Transformation of Msh2-Deficient Colon Epithelial Cells. **Cell**, [S.L.], v. 158, n. 2, p. 288-299, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.051>.

BERLIM, Marcelo T; TURECKI, Gustavo. Definition, Assessment, and Staging of Treatment—Resistant Refractory Major Depression: a review of current concepts and

methods. **The Canadian Journal Of Psychiatry**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 46-54, jan. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/070674370705200108>.

BESTEN, Gijs Den; VAN EUNEN, Karen; GROEN, Albert K.; VENEMA, Koen; REIJNGOUD, Dirk-Jan; BAKKER, Barbara M.. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal Of Lipid Research**, [S.L.], v. 54, n. 9, p. 2325-2340, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.r036012>.

BONADIMAN, Cecília Silva Costa; MALTA, Deborah Carvalho; PASSOS, Valéria Maria de Azeredo; NAGHAVI, Mohsen; MELO, Ana Paula Souto. Depressive disorders in Brazil: results from the global burden of disease study 2017. **Population Health Metrics**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 0-0, set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12963-020-00204-5>.

CASPI, Ron; ALTMAN, Tomer; BILLINGTON, Richard; DREHER, Kate; FOERSTER, Hartmut; FULCHER, Carol A.; HOLLAND, Timothy A.; KESELER, Ingrid M.; KOTHARI, Anamika; KUBO, Aya. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 459-471, 12 nov. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1103>.

CHEN, Zhi; LI, Jie; GUI, Siwen; ZHOU, Chanjuan; CHEN, Jianjun; YANG, Chuangchuang; HU, Zicheng; WANG, Haiyang; ZHONG, Xiaogang; ZENG, Li. Comparative metaproteomics analysis shows altered fecal microbiota signatures in patients with major depressive disorder. **Neuroreport**, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 417-425, 21 mar. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/wnr.0000000000000985>.

CHUNG, Yu-Chu Ella; CHEN, Hsi-Chung; CHOU, Hsiang-Chin Lori; CHEN, I-Ming; LEE, Meei-Shyuan; CHUANG, Li-Chung; LIU, Yen-Wenn; LU, Mong-Liang; CHEN, Chun-Hsin; WU, Chi-Shin. Exploration of microbiota targets for major depressive disorder and mood related traits. **Journal Of Psychiatric Research**, [S.L.], v. 111, p. 74-82, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.01.016>.

CRESCI, G. A. M.; IZZO, K. (2019). Gut Microbiome. Adult Short Bowel Syndrome: **Nutritional, Medical, and Surgical Management**, 45–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814330-8.00004-4>

DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F.. Regulation of the stress response by the gut microbiota: implications for psychoneuroendocrinology. **Psychoneuroendocrinology**, [S.L.], v. 37, n. 9, p. 1369-1378, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.03.007>.

DING, Yang; BU, Fan; CHEN, Tuo; SHI, Guoping; YUAN, Xiaomin; FENG, Zeyu; DUAN, Zhenglan; WANG, Rong; ZHANG, Sumin; WANG, Qiong. A next-generation probiotic: *akkermansia muciniphila* ameliorates chronic stress-induced depressive-like behavior in mice by regulating gut microbiota and metabolites. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 105, n. 21-22, p. 8411-8426, 7 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11622-2>.

DINGLEDINE R, MC BAIAN CJ. Glutamate and Aspartate Are the Major Excitatory Transmitters in the Brain. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28252/>

FOSTER, Jane A.; NEUFELD, Karen-Anne McVey. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 305-312, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.005>.

FOSTER, Jane; ZHOU, Linghong (Linda). Psychobiotics and the gut-brain axis: in the pursuit of happiness. **Neuropsychiatric Disease And Treatment**, [S.L.], p. 715-715, mar. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ndt.s61997>.

GATTI, S.; BARTFAI, T. Induction of tumor necrosis factor- α mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. **Brain Research**, [S.L.], v. 624, n. 1-2, p. 291-294, out. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90090-a](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)90090-a).

GOPALAKRISHNAN, V.; SPENCER, C. N.; NEZI, L.; REUBEN, A.; ANDREWS, M. C.; KARPINETS, T. V.; PRIETO, P. A.; VICENTE, D.; HOFFMAN, K.; WEI, S. C.. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. **Science**, [S.L.], v. 359, n. 6371, p. 97-103, 5 jan. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aan4236>.

GUILLOUX, J-P; DOUILLARD-GUILLOUX, G; KOTA, R; WANG, X; GARDIER, A M; MARTINOWICH, K; TSENG, G C; A LEWIS, D; SIBILLE, E. Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. **Molecular Psychiatry**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 1130-1142, 13 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2011.113>.

GUPTA, Vinod K.; KIM, Minsuk; BAKSHI, Utpal; CUNNINGHAM, Kevin Y.; DAVIS, John M.; LAZARIDIS, Konstantinos N.; NELSON, Heidi; CHIA, Nicholas; SUNG, Jaeyun. A predictive index for health status using species-level gut microbiome profiling. **Nature Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, 15 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18476-8>.

HANSEN, Matthew E. B.; RUBEL, Meagan A.; BAILEY, Aubrey G.; RANCIARO, Alessia; THOMPSON, Simon R.; CAMPBELL, Michael C.; BEGGS, William; DAVE, Jaanki R.; MOKONE, Gaonyadiwe G.; MPOLOKA, Sununguko Wata. Population structure of human gut bacteria in a diverse cohort from rural Tanzania and Botswana. **Genome Biology**, [S.L.], v. 20, n. 1, 22 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-018-1616-9>.

HERMAN, James P.; MCKLVEEN, Jessica M.; GHOSAL, Sriparna; KOPP, Brittany; WULSIN, Aynara; MAKINSON, Ryan; SCHEIMANN, Jessie; MYERS, Brent. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. **Comprehensive Physiology**, [S.L.], p. 603-621, 15 mar. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c150015>.

HOGUE, E. A.; IVKOVIC, A.; FRICCHIONE, G. L.. Generalized anxiety disorder: diagnosis and treatment. **Bmj**, [S.L.], v. 345, n. 272, p. 7500-7500, 27 nov. 2012. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.e7500>.

HOLTZHEIMER, Paul; NEMEROFF, Charles B. Future prospects in depression research. **Dialogues In Clinical Neuroscience**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 175-189, jun. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.31887/dcns.2006.8.2/pholtzheimer..>

HUANG, Lili; ZHAO, Yunzhi; QIANG, Chunfang; FAN, Bozhen. Is cognitive behavioral therapy a better choice for women with postnatal depression? A systematic review and meta-analysis. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 0205243-0205243, 15 out. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0205243>.

JANDHYALA, Sai Manasa. Role of the normal gut microbiota. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 21, n. 29, p. 8787, 2015. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>.

JIANG, Haiyin; LING, Zongxin; ZHANG, Yonghua; MAO, Hongjin; MA, Zhanping; YIN, Yan; WANG, Weihong; TANG, Wenxin; TAN, Zhonglin; SHI, Jianfei. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, And Immunity*, [S.L.], v. 48, p. 186-194, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.016>.

JIN, Min; LU, Ji; CHEN, Zhaoyu; NGUYEN, Son Hoang; MAO, Likai; LI, Junwen; YUAN, Zhiguo; GUO, Jianhua. Antidepressant fluoxetine induces multiple antibiotics resistance in *Escherichia coli* via ROS-mediated mutagenesis. **Environment International**, [S.L.], v. 120, p. 421-430, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.046>.

KABEERDOSS, Jayakanthan; SANKARAN, Vijayalakshmi; PUGAZHENDHI, Srinivasan; RAMAKRISHNA, Balakrishnan s. Clostridium leptum group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case-control study in india. **Bmc Gastroenterology**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 0-0, 26 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-230x-13-20>.

KANEHISA, Minoru; SATO, Yoko; KAWASHIMA, Masayuki; FURUMICHI, Miho; TANABE, Mao. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 457-462, 17 out. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1070>.

KARIN N. WESTLUND, WILLIAN D. WILLIS, in [The Rat Nervous System \(Fourth Edition\)](#), 2015

KOH, Ara; VADDER, Filipe de; KOVATCHEVA-DATCHARY, Petia; BÄCKHED, Fredrik. From Dietary Fiber to Host Physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, [S.L.], v. 165, n. 6, p. 1332-1345, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>.

KOLMOGOROV-SMIRNOV Test. In: *The Concise Encyclopedia of Statistics*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-32833-1_214

KOVATCHEVA-DATCHARY, Petia; NILSSON, Anne; AKRAMI, Rozita; LEE, Ying Shiuian; DEVADDER, Filipe; ARORA, Tulika; HALLEN, Anna; MARTENS, Eric; BJÖRCK, Inger; BÄCKHED, Fredrik. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 971-982, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>.

KUEHNER, Christine. Why is depression more common among women than among men? **The Lancet Psychiatry**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 146-158, fev. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366\(16\)30263-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366(16)30263-2).

KUNTZ, Thomas M.; GILBERT, Jack A.. Introducing the Microbiome into Precision Medicine. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 81-91, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.001>.

LARSEN, Jeppe Madura. The immune response to Prevotellabacteria in chronic inflammatory disease. **Immunology**, [S.L.], v. 151, n. 4, p. 363-374, 20 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12760>.

LAYÉ, Sophie; PARNET, Patricia; GOUJON, Emmanuelle; DANTZER, Robert. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. **Molecular Brain Research**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 157-162, nov. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90197-x](http://dx.doi.org/10.1016/0169-328x(94)90197-x).

LIN, Ping; DING, Bingyu; FENG, Chunyan; YIN, Shuwei; ZHANG, Ting; QI, Xin; LV, Huiying; GUO, Xiaokui; DONG, Ke; ZHU, Yongzhang. Prevotella and Klebsiella proportions in fecal microbial communities are potential characteristic parameters for patients with major depressive disorder. **Journal Of Affective Disorders**, [S.L.], v. 207, p. 300-304, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2016.09.051>.

LU, Yun-Rong; FU, Xin-Yan; SHI, Li-Gen; JIANG, Yan; WU, Juan-Li; WENG, Xiao-Juan; WANG, Zhao-Pin; WU, Xue-Yan; LIN, Zheng; LIU, Wei-Bo. Decreased plasma neuroactive amino acids and increased nitric oxide levels in melancholic major depressive disorder. **Bmc Psychiatry**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 0-0, 27 abr. 2014. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-244x-14-123>.

LUO, Yuanyuan; ZENG, Benhua; ZENG, Li; DU, Xiangyu; LI, Bo; HUO, Ran; LIU, Lanxiang; WANG, Haiyang; DONG, Meixue; PAN, Junxi. Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 0-0, 7 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-018-0240-5>.

MALLICK, Himel; RAHNAVARD, Ali; MCIVER, Lauren J.; MA, Siyuan; ZHANG, Yancong; NGUYEN, Long H.; TICKLE, Timothy L.; WEINGART, George; REN, Boyu; SCHWAGER, Emma H.. Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies. **Biorxiv**, [S.L.], p. 0-0, 20 jan. 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.01.20.427420>.

MICHAIL, Sonia; LIN, Malinda; FREY, Mark R.; FANTER, Rob; PALIY, Oleg; HILBUSH, Brian; REO, Nicholas V. Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 91, n. 2, p. 1-9, 5 dez. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiu002>.

MISTRY, Jaina; CHUGURANSKY, Sara; WILLIAMS, Lowri; QURESHI, Matloob; SALAZAR, Gustavo A; SONNHAMMER, Erik L L; TOSATTO, Silvio C e; PALADIN, Lisanna; RAJ, Shriya; RICHARDSON, Lorna J. Pfam: the protein families database in 2021. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 412-419, 30 out. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.

MORRIS, Gerwyn; BERK, Michael; CARVALHO, Andre; CASO, Javier R.; SANZ, Yolanda; WALDER, Ken; MAES, Michael. The Role of the Microbial Metabolites Including Tryptophan Catabolites and Short Chain Fatty Acids in the Pathophysiology of Immune-Inflammatory and Neuroimmune Disease. **Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 54, n. 6, p. 4432-4451, 27 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0004-2>.

THE MICROSSETA INIATIVE. Disponível em: <https://microsetta.ucsd.edu/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

NASERIBAFROUEI, A.; HESTAD, K.; AVERSHINA, E.; SEKELJA, M.; LINLØKKEN, A.; WILSON, R.; RUDI, K.. Correlation between the human fecal microbiota and depression. **Neurogastroenterology & Motility**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 1155-1162, 1 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nmo.12378>.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. Disponível em: www.nimh.nih.gov/health/statistics/prevalence/major-depression-among-adults.shtml> Acesso em 24 de novembro de 2021.

NIKOLAIDIS, I.; FAVINI-STABILE, S.; DESSEN, A.. Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. **Protein Science**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 243-259, 17 jan. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.2414>.

O'CALLAGHAN, Amy; VAN SINDEREN, Douwe. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 0-0, 15 jun. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>.

OSTER, Jane A.; NEUFELD, Karen-Anne McVey. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 305-312, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.005>.

OTARU, Nize; YE, Kun; MUJEZINOVIC, Denisa; BERCHTOLD, Laura; CONSTANCIAS, Florentin; CORNEJO, Fabián A.; KRZYSZEK, Adam; WOUTERS, Tomas de; BRAEGGER, Christian; LACROIX, Christophe. GABA Production by Human Intestinal Bacteroides spp.: prevalence, regulation, and role in acid stress tolerance. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 0-0, 15 abr. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.656895>.

PACKER, B.R.; YEAGER, M.; BURDETT, L.; WELCH, R.; BEERMAN, M.; Qi, L.; SICOTTE, H.; STAATS, B.; ACHARYA, M.; CRENSHAW, A.; ECKERT, A.; PURI, V.; GERHARD, D.S.; CHANOCK, S.J. 2006. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation assay development and frequency analysis for genetic variation. *Nucleic Acid Research*, 34 (Database Issue): D617-D621.

SIMPSON, Carra A.; MU, Andre; HASLAM, Nick; SCHWARTZ, Orli S.; SIMMONS, Julian G.. Feeling down? A systematic review of the gut microbiota in anxiety/depression and irritable bowel syndrome. **Journal Of Affective Disorders**, [S.L.], v. 266, p. 429-446, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2020.01.124>.

STEVENS, Bruce R; GOEL, Ruby; SEUNGBUM, Kim; RICHARDS, Elaine M; HOLBERT, Richard C; PEPINE, Carl J; RAIZADA, Mohan K. Increased human intestinal barrier permeability plasma biomarkers zonulin and FABP2 correlated with plasma LPS and altered gut microbiome in anxiety or depression. **Gut**, [S.L.], v. 67, n. 8, p. 1555.2-1557, 16 ago. 2017. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314759>.

PETROSINO, Joseph F.. The microbiome in precision medicine: the way forward. **Genome Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 0-0, 22 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-018-0525-6>.

PUNDER, Karin de; PRUIMBOOM, Leo. Stress Induces Endotoxemia and Low-Grade Inflammation by Increasing Barrier Permeability. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 6, p. 0-0, 15 maio 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00223>.

R CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RÍOS-COVIÁN, David; RUAS-MADIEDO, Patricia; MARGOLLES, Abelardo; GUEIMONDE, Miguel; REYES-GAVILÁN, Clara G. de Los; SALAZAR, Nuria. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 0-0, 17 fev. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>.

RONG, Han; XIE, Xin-Hui; ZHAO, Jie; LAI, Wen-Tao; WANG, Ming-Bang; XU, Dan; LIU, Yang-Hui; GUO, Yuan-Yuan; XU, Shu-Xian; DENG, Wen-Feng. Similarly in depression, nuances of gut microbiota: evidences from a shotgun metagenomics sequencing study on major depressive disorder versus bipolar disorder with current major depressive episode patients. **Journal Of Psychiatric Research**, [S.L.], v. 113, p. 90-99, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.03.017>.

ROSHCHINA, Victoria V.. New Trends and Perspectives in the Evolution of Neurotransmitters in Microbial, Plant, and Animal Cells. *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health*, [S.L.], p. 25-77, 2016. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-20215-0_2.

RYAN, John F.; DINAN, Timothy G.. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 13, n. 10, p.

701-712, 12 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3346>.

SANADA, Kenji; NAKAJIMA, Shinichiro; KUROKAWA, Shunya; BARCELÓ-SOLER, Alberto; IKUSE, Daisuke; HIRATA, Akihito; YOSHIZAWA, Akira; TOMIZAWA, Yoshihiro; SALAS-VALERO, Montserrat; NODA, Yoshihiro. Gut microbiota and major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis. **Journal Of Affective Disorders**, [S.L.], v. 266, p. 1-13, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2020.01.102>

SANTISO, Rebeca; TAMAYO, María; GOSÁLVEZ, Jaime; BOU, Germán; FERNÁNDEZ, María del Carmen; FERNÁNDEZ, José Luis. A rapid in situ procedure for determination of bacterial susceptibility or resistance to antibiotics that inhibit peptidoglycan biosynthesis. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 0-0, 25 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-191>.

SASSARINI, Dr Jenifer. Depression in midlife women. **Maturitas**, [S.L.], v. 94, p. 149-154, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.09.004>.

SCHOLL OF PUBLIC HEALTH. . The Microbiome: what is the microbiome?. What is the microbiome?. 2020. Disponível em: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/microbiome/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

SHARPTON, Thomas J.. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 5, p. 0-0, 16 jun. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>.

SILVA, Luiz Cesar C Pereira da; CHUMBINHO, Lucianne Cardoso; PIZZIN, Caroline Corrêa; BATISTA, Wanderson Silva; OLIVEIRA, Fabio Souza de; OLIVEIRA, Gabriel Melo de. O uso de animais de laboratórios como modelos experimentais para o estudo de transtornos psiquiátricos. *Rescal*, São Paulo, v. 1, n. 0, p. 270-278, ago. 2012.

SKONIECZNA-ŚYDECKA, Karolina; GROCHANS, Elżbieta; MACIEJEWSKA, Dominika; SZKUP, Małgorzata; SCHNEIDER-MATYKA, Daria; JURCZAK, Anna; ŁONIEWSKI, Igor; KACZMARCZYK, Mariusz; MARLICZ, Wojciech; CZERWIŃSKA-ROGOWSKA, Maja. Faecal Short Chain Fatty Acids Profile is Changed in Polish Depressive Women. *Nutrients*, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1939, 7 dez. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu10121939>.

SOUZA, Ildebrando Moraes de; MACHADO-DE-SOUSA, João Paulo. Brazil: world leader in anxiety and depression rates. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 384-384, dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2017-2300>.

SUDO, Nobuyuki; CHIDA, Yoichi; AIBA, Yuji; SONODA, Junko; OYAMA, Naomi; YU, Xiao-Nian; KUBO, Chiharu; KOGA, Yasuhiro. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 558, n. 1, p. 263-275, 24 jun. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>.

SZYSZKOWICZ, Joanna Kasia; WONG, Alex; ANISMAN, Hymie; MERALI, Zul; AUDET, Marie-Claude. Implications of the gut microbiota in vulnerability to the social avoidance effects of chronic social defeat in male mice. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 66, p. 45-55, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.009>.

TETT, Adrian; HUANG, Kun D.; ASNICAR, Francesco; FEHLNER-PEACH, Hannah; PASOLLI, Edoardo; KARCHER, Nicolai; ARMANINI, Federica; MANGHI, Paolo; BONHAM, Kevin; ZOLFO, Moreno. The Prevotella copri Complex Comprises Four Distinct Clades Underrepresented in Westernized Populations. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 666-679, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.018>.

THE MICROSETTA INITIATIVE. Disponível em: <<https://microsetta.ucsd.edu/>> Acesso em 25 de novembro de 2021.

THIBODEAU, Michel A.; WELCH, Patrick G.; SAREEN, Jitender; ASMUNDSON, Gordon J. G.. ANXIETY DISORDERS ARE INDEPENDENTLY ASSOCIATED WITH SUICIDE IDEATION AND ATTEMPTS: propensity score matching in two epidemiological samples. **Depression And Anxiety**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 947-954, out. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/da.22203>.

TILLMANN, Sandra; ABILDGAARD, Anders; WINTHER, Gudrun; WEGENER, Gregers. Altered fecal microbiota composition in the Flinders sensitive line rat model of depression. **Psychopharmacology**, [S.L.], v. 236, n. 5, p. 1445-1457, 23 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-018-5094-2>.

TORRES, Felix (comp.). **What Is Depression?** 2020. Disponível em: <https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>. Acesso em: 15 jul. 2021.

TURNBAUGH, Peter J.; LEY, Ruth E.; HAMADY, Micah; FRASER-LIGGETT, Claire M.; KNIGHT, Rob; GORDON, Jeffrey I.. The Human Microbiome Project. **Nature**, [S.L.], v. 449, n. 7164, p. 804-810, out. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06244>.

UNGER, Marcus M.; SPIEGEL, Jörg; DILLMANN, Klaus-Ulrich; GRUNDMANN, David; PHILIPPEIT, Hannah; BÜRMAN, Jan; FAßBENDER, Klaus; SCHWIERTZ, Andreas; SCHÄFER, Karl-Herbert. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. **Parkinsonism & Related Disorders**, [S.L.], v. 32, p. 66-72, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.08.019>.

URITSKIY, Gherman V.; DIRUGGIERO, Jocelyne; TAYLOR, James. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. **Microbiome**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 0-0, 15 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-018-0541-1>.

URSELL, Luke K; METCALF, Jessica L; PARFREY, Laura Wegener; KNIGHT, Rob. Defining the human microbiome. **Nutrition Reviews**, [S.L.], v. 70, p. 38-44, ago. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493>.

VENEGAS, Daniela Parada; LAFUENTE, Marjorie K. de; LANDSKRON, Glauben; GONZÁLEZ, María Julieta; QUERA, Rodrigo; DIJKSTRA, Gerard; HARMSEN, Hermie J. M.; FABER, Klaas Nico; HERMOSO, Marcela A.. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 0-0, 11 mar. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>.

VENKATARAMAN, A.; SIEBER, J. R.; SCHMIDT, A. W.; WALDRON, C.; THEIS, K. R.; SCHMIDT, T. M.. Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch. **Microbiome**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 0-0, 29 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-016-0178-x>.

VOLKOW, N. D.; WANG, G.-J.; FOWLER, J. S.; TOMASI, D.; TELANG, F.. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 108, n. 37, p. 15037-15042, 14 mar. 2011. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010654108>.

YAGHOUBFAR, Rezvan; BEHROUZI, Ava; ASHRAFIAN, Fatemeh; SHAHRYARI, Arefeh; MORADI, Hamid Reza; CHOOPANI, Samira; HADIFAR, Shima; VAZIRI, Farzam; NOJOUMI, Seyed Ali; FATEH, Abolfazl. Modulation of serotonin signaling/metabolism by Akkermansia muciniphila and its extracellular vesicles through the gut-brain axis in mice. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 0-0, dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-79171-8>.

YANG, Chun; QU, Youge; FUJITA, Yuko; REN, Qian; MA, Min; DONG, Chao; HASHIMOTO, Kenji. Possible role of the gut microbiota–brain axis in the antidepressant effects of (R)-ketamine in a social defeat stress model. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 0-0, dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-017-0031-4>.

YOSHIDA, Naofumi; YAMASHITA, Tomoya; KISHINO, Shigenobu; WATANABE, Hikaru; SASAKI, Kengo; SASAKI, Daisuke; TABATA, Tokiko; SUGIYAMA, Yuta; KITAMURA, Nahoko; SAITO, Yoshihiro. A possible beneficial effect of Bacteroides on faecal lipopolysaccharide activity and cardiovascular diseases. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 0-0, 3 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-69983-z>.

YU, Meng; JIA, Hongmei; ZHOU, Chao; YANG, Yong; ZHAO, Yang; YANG, Maohua; ZOU, Zhongmei. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 138, p. 231-239, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.008>.

WOUW, Marcel van de; BOEHME, Marcus; LYTE, Joshua M.; WILEY, Niamh; STRAIN, Conall; O'SULLIVAN, Orla; CLARKE, Gerard; STANTON, Catherine; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F.. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 596, n. 20, p. 4923-4944, 28 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jp276431>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/depression#tab=tab_2> Acesso em: 03 de janeiro de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and Other Common Mental Disorders. 2017 Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/depression-global-health-estimates>

ZHENG, P; ZENG, B; ZHOU, C; LIU, M; FANG, Z; XU, X; ZENG, L; CHEN, J; FAN, S; DU, X. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. **Molecular Psychiatry**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 786-796, 12 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.44>.

ZHUANG, Zhenhuang; YANG, Ruotong; WANG, Wenxiu; QI, Lu; HUANG, Tao. Associations between gut microbiota and Alzheimer's disease, major depressive disorder, and schizophrenia. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 0-0, 2 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-020-01961-8>.

10. ANEXOS

Anexo 1: bancos de dados públicos citados e respectivos endereços eletrônicos.

1. MetaHIT (<https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/metahit/>);
2. Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>);
3. ICGC (<https://icgc.org/>);
4. GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).
5. NIH (<https://hmpdacc.org/>)
6. American Gut (<http://americangut.org>)
7. Chocoplhan

Anexo 2. Metadados e questionário de pré-coleta.

Anexo 2.1 Questionário pré-coleta

- 1 Nome
- 2 Email
- 3 Celular
- 4 Estado
- 9 Profissão

- 10 **Sexo?**
- 11 **Altura**
- 12 **Peso**
- 13 **Idade**
- 14 **Você está realizando algum tipo de dieta atualmente ou tem algum cuidado especial na sua alimentação?**
- 15 **Dieta?**
- 16 **Informe o recordatório alimentar de 1 dia (Café da manhã, lanche, almoço, lanche e jantar.***
- 17 **Você tem algum "vício" (café, refrigerante, chocolate, cigarro, etc.)?***
- 18 **Qual vício?**
- 19 **Você tem algum "vício" (café, refrigerante, chocolate, cigarro, etc.)?***
- 20 **Qual medicamento?**
- 21 **Suplementos em uso atualmente (vitaminas, aminoácidos, fitoterápicos):***
- 22 **Probiótico em uso atualmente?***
- 23 **Você fez uso de antibióticos, corticóides ou remédios para emagrecer nos últimos 3 meses?***
- 24 **Qual**
- 25 **Já passou por algum tipo de tratamento quimioterápico?***
- 26 **Se sim, qual? Data?**
- 27 **Assinale caso possua diagnóstico para as seguintes condições clínicas e especifique a data do diagnóstico na caixa de texto abaixo:**
- Doença de Crohn
 - Síndrome do intestino irritável
 - Doença inflamatória intestinal
 - Colite Ulcerativa
 - Dispepsia
 - Doença celíaca
 - Intolerância a lactose
 - Diabetes
 - Câncer
 - Depressão
 - Autismo
 - Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
 - Transtorno de ansiedade

Asma
Alergia
Artrite Reumatoide
Lúpus Eritematoso sistêmico
Osteoartrite

28 Caso possua algum diagnóstico não especificado acima, por favor, descrever:

29 Assinale abaixo caso possua algum dos sintomas descritos:

Náusea
Dor abdominal
Distensão abdominal
Diarreia
Sensibilidade abdominal
Flatulência
Constipação
Vômito

30 Os sintomas indicados iniciaram há quanto tempo?

31 Caso possua algum outro sintoma que julgue importante relatar, especifique:

32 Você pratica alguma atividade física com regularidade? Se sim, quantas horas semanais?*

33 Qual a modalidade?

34 Sua forma de nascimento:*

Anexo 2.2 Metadados

Disponível em:

[Metadados](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1mYxrJLOTZhsquP10qH2uD8JRwWo22t4N4x9kFt1oU4/edit?usp=sharing)<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1mYxrJLOTZhsquP10qH2uD8JRwWo22t4N4x9kFt1oU4/edit?usp=sharing>

Anexo 3. Tabelas

Anexo 3.1 Tabela de Idade. Amostras separadas por as categorias de idade e sexo dentro do seu respectivo grupo.

IDADE	Total COM	%	Total T_DEP	%	Total T_DEP_ANS	%
Até 30 anos	3	10.3%	2	6.9%	2	6.9%
De 31 até 45 anos	13	44.8%	8	27.6%	9	31.0%
Acima de 45 anos	13	44.8%	6	20.7%	2	6.9%
	29	100.0%	16	55.2%	13	44.8%

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.2 Tabela do percentual de abundância relativa por Filo em cada grupo.

FILO	CON	T_DEP	T_DEP_ANS	% TOTAL
p__Bacteroidetes	72.7%	61.1%	68.9%	68.6%
p__Firmicutes	23.2%	30.0%	22.5%	24.9%
p__Proteobacteria	1.8%	2.9%	2.2%	2.2%
p__Verrucomicrobia	1.0%	3.7%	2.7%	2.1%
p__Actinobacteria	0.7%	1.7%	1.5%	1.2%
p__Viruses_unclassified	0.6%	0.6%	2.1%	0.9%
p__Eukaryota_unclassified	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
p__Lentisphaerae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
p__Euryarchaeota	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
p__Synergistetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
p__Candidatus_Melainabacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
p__Fusobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
p__Spirochaetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.3 Tabela do percentual de abundância relativa por gênero em cada grupo.

GÊNERO	CON	T_DEP	T_DEP_ANS	% TOTAL
g__Bacteroides	42.3%	34.2%	40.7%	39.7%
g__Prevotella	13.1%	12.3%	16.0%	13.5%
g__Alistipes	9.8%	8.3%	6.1%	8.5%
g__Faecalibacterium	6.2%	5.7%	5.4%	5.9%
g__Parabacteroides	4.6%	4.3%	4.8%	4.6%
g__Eubacterium	2.9%	5.8%	2.5%	3.6%
g__Roseburia	2.3%	2.6%	2.3%	2.4%
g__Akkermansia	1.0%	3.7%	2.7%	2.1%
g__Ruminococcus	1.2%	2.9%	0.8%	1.6%
g__Lachnospiraceae_unclassified	1.3%	0.9%	2.1%	1.4%
g__Oscillibacter	1.2%	1.4%	1.2%	1.3%
g__Ruminococcaceae_unclassified	0.6%	1.8%	1.1%	1.1%

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.4 Tabela do percentual de abundância relativa por Espécie em cada grupo.

ESPÉCIE	CON	T_DEP	T_DEP ANS	% TOTAL
<i>s_Prevotella_copri</i>	12.1%	9.2%	11.2%	11.1%
<i>s_Bacteroides_uniformis</i>	9.0%	8.6%	10.1%	9.1%
<i>s_Bacteroides_vulgatus</i>	11.2%	7.1%	6.3%	9.0%
<i>s_Alistipes_putredinis</i>	7.7%	4.8%	4.2%	6.1%
<i>s_Bacteroides_dorei</i>	6.4%	4.5%	6.9%	6.0%
<i>s_Faecalibacterium_prausnitzii</i>	6.2%	5.7%	5.4%	5.9%
<i>s_Bacteroides_stercoris</i>	4.2%	1.9%	6.5%	4.1%
<i>s_Parabacteroides_distasonis</i>	3.1%	2.5%	3.1%	2.9%
<i>s_Eubacterium_sp_CAG_180</i>	2.1%	3.2%	1.8%	2.3%
<i>s_Akkermansia_muciniphila</i>	1.0%	3.7%	2.7%	2.1%
<i>s_Alistipes_finegoldii</i>	1.4%	2.6%	0.8%	1.6%
<i>s_Bacteroides_thetaiotaomicron</i>	1.2%	0.9%	3.4%	1.6%
<i>s_Eubacterium_rectale</i>	1.3%	0.9%	2.1%	1.4%
<i>s_Parabacteroides_merdae</i>	1.2%	1.7%	1.5%	1.4%
<i>s_Bacteroides_ovatus</i>	1.3%	1.1%	1.8%	1.3%
<i>s_Bacteroides_caccae</i>	1.6%	1.4%	0.6%	1.3%
<i>s_Bacteroides_eggerthii</i>	1.4%	1.7%	0.6%	1.3%
<i>s_Eubacterium_siraeum</i>	0.6%	1.8%	1.0%	1.0%

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.5 Média de diversidade encontrada dentro de cada grupo e a significância da sua diferença conforme ks test.

Grupos	median_Shannon	median_Simpson	median_InvSimpson
T_DEP_ANS	2.63	0.87	7.51
CON	2.79	0.89	9.03
T_DEP	2.87	0.90	9.68

ks test	median_Shannon	median_Simpson	median_InvSimpson
CON x T_DEP_ANS	0.83	0.83	0.83
CON x T_DEP	0.37	0.39	0.39

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.6. Processos biológicos diferentemente abundantes no grupo T_DEP e T_DEP_ANS.

PROCESSO BIOLÓGICO (T_DEP)	LOG2	p.value	Abundância
GO:0032196: [BP] transposition	0.61	0.00	Aumentada
GO:0019354: [BP] siroheme biosynthetic process	0.70	0.00	Aumentada
GO:0019379: [BP] sulfate assimilation, phosphoadenylyl sulfate reduction by phosphoadenylyl-sulfate reductase (thioredoxin)	1.78	0.01	Aumentada
GO:0070395: [BP] lipoteichoic acid biosynthetic process	2.58	0.01	Aumentada
GO:0006303: [BP] double-strand break repair via nonhomologous end joining	3.39	0.01	Aumentada
GO:0039686: [BP] bidirectional double-stranded viral DNA replication	6.07	0.01	Aumentada
GO:0019344: [BP] cysteine biosynthetic process	1.55	0.01	Aumentada
GO:0009298: [BP] GDP-mannose biosynthetic process	1.46	0.01	Aumentada
GO:0006888: [BP] ER to Golgi vesicle-mediated transport	1.60	0.01	Aumentada
GO:0006782: [BP] protoporphyrinogen IX biosynthetic process	0.22	0.01	Aumentada
GO:0018307: [BP] enzyme active site formation	1.32	0.01	Aumentada
GO:0019572: [BP] L-arabinose catabolic process	1.07	0.01	Aumentada
GO:0046080: [BP] dUTP metabolic process	0.39	0.01	Aumentada
GO:0071470: [BP] cellular response to osmotic stress	-0.33	0.02	Reduzida
GO:0034605: [BP] cellular response to heat	-0.20	0.02	Reduzida
GO:0006955: [BP] immune response	3.53	0.02	Aumentada

PROCESSO BIOLÓGICO (T_DEP_ANS)	LOG2	p.value	Abundância
GO:0006531: [BP] aspartate metabolic process	1.09	0.00	Aumentada
GO:0039686: [BP] bidirectional double-stranded viral DNA replication	7.88	0.00	Aumentada
GO:0019478: [BP] D-amino acid catabolic process	-0.21	0.00	Reduzida
GO:0032196: [BP] transposition	0.48	0.00	Aumentada
GO:0019569: [BP] L-arabinose catabolic process to xyhulose 5-phosphate	0.38	0.00	Aumentada
GO:0043470: [BP] regulation of carbohydrate catabolic process	3.86	0.00	Aumentada
GO:0019379: [BP] sulfate assimilation, phosphoadenylyl sulfate reduction by phosphoadenylyl-sulfate reductase (thioredoxin)	1.93	0.00	Aumentada
GO:0035556: [BP] intracellular signal transduction	-0.88	0.00	Reduzida
GO:0006003: [BP] fructose 2,6-bisphosphate metabolic process	1.27	0.01	Aumentada
GO:0007186: [BP] G-protein coupled receptor signaling pathway	1.69	0.01	Aumentada
GO:0006568: [BP] tryptophan metabolic process	2.20	0.01	Aumentada
GO:0032790: [BP] ribosome disassembly	1.51	0.01	Aumentada
GO:0006000: [BP] fructose metabolic process	1.37	0.01	Aumentada
GO:0007218: [BP] neuropeptide signaling pathway	1.68	0.02	Aumentada
GO:0016567: [BP] protein ubiquitination	2.56	0.02	Aumentada

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.7 Funções moleculares diferentemente abundantes no grupo T_DEP e T_DEP_ANS.

FUNÇÃO MOLECULAR (T_DEP)	LOG2	p.value	Abundância
GO:0004064: [MF] arylesterase activity	1.58	0.00	Aumentada
GO:0004158: [MF] dihydroorotate oxidase activity	2.30	0.00	Aumentada
GO:0008536: [MF] Ran GTPase binding	4.19	0.00	Aumentada
GO:0019180: [MF] dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase activity	2.60	0.00	Aumentada
GO:0043800: [MF] hexulose-6-phosphate isomerase activity	2.89	0.00	Aumentada
GO:0047474: [MF] long-chain fatty acid luciferin component ligase activity	1.45	0.00	Aumentada
GO:0008883: [MF] glutamyl-tRNA reductase activity	0.83	0.00	Aumentada
GO:0050538: [MF] N-carbamoyl-L-amino-acid hydrolase activity	1.19	0.00	Aumentada
GO:0004655: [MF] porphobilinogen synthase activity	0.76	0.00	Aumentada
GO:0009973: [MF] adenylyl-sulfate reductase activity	2.57	0.00	Aumentada
GO:0015419: [MF] sulfate transmembrane-transporting ATPase activity	0.64	0.00	Aumentada
GO:0017040: [MF] ceramidase activity	-5.32	0.00	Reduzida
GO:0042286: [MF] glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase activity	0.84	0.00	Aumentada
GO:0015668: [MF] Type III site-specific deoxyribonuclease activity	3.47	0.00	Aumentada
GO:0047732: [MF] CDP-abequose epimerase activity	2.67	0.00	Aumentada

FUNÇÃO MOLECULAR (T_DEP_ANS)	LOG2	p.value	Abundância
GO:0008146: [MF] sulfotransferase activity	2.74	0.00	Aumentada
GO:0016744: [MF] transferase activity, transferring aldehyde or ketonic groups	2.05	0.00	Aumentada
GO:0047407: [MF] ADP-ribosyl-[dinitrogen reductase] hydrolase activity	-5.65	0.00	Reduzida
GO:0043908: [MF] Ser(Gly)-tRNA(Ala) hydrolase activity	-0.21	0.00	Reduzida
GO:0046555: [MF] acetylxylan esterase activity	1.32	0.00	Aumentada
GO:0003873: [MF] 6-phosphofructo-2-kinase activity	1.58	0.00	Aumentada
GO:0004435: [MF] phosphatidylinositol phospholipase C activity	-1.24	0.00	Reduzida
GO:0015591: [MF] D-ribose transmembrane transporter activity	1.07	0.00	Aumentada
GO:0016774: [MF] phosphotransferase activity, carboxyl group as acceptor	1.40	0.00	Aumentada
GO:0016874: [MF] ligase activity	0.14	0.00	Aumentada
GO:0051499: [MF] D-aminoacyl-tRNA deacylase activity	-0.26	0.00	Reduzida
GO:0055041: [MF] cyclopentanol dehydrogenase activity	3.98	0.00	Aumentada
GO:0019179: [MF] dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose transaminase activity	2.76	0.00	Aumentada
GO:0008733: [MF] L-arabinose isomerase activity	0.35	0.01	Aumentada
GO:0000224: [MF] peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)l asparagine amidase activity	1.37	0.04	Aumentada

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.8 Termos do Kegg orthology diferentemente abundantes no grupo T_DEP e T_DEP_ANS.

KEGG ORTHOLOGY (T_DEP)	LOG2	p.value	Abundância
K02977: small subunit ribosomal protein S27Ae	6.52	0.00	Aumentada
K06397: stage III sporulation protein AH	1.44	0.00	Aumentada
K08369: MFS transporter, putative metabolite:H ⁺ symporter	3.91	0.00	Aumentada
K02108: F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit a	1.11	0.00	Aumentada
K02026: multiple sugar transport system permease protein	1.43	0.00	Aumentada
K00337: NADH-quinone oxidoreductase subunit H [EC:1.6.5.3]	-0.55	0.00	Reduzida
K01628: L-fucose-phosphate aldolase [EC:4.1.2.17]	1.82	0.00	Aumentada
K01515: ADP-ribose pyrophosphatase [EC:3.6.1.13]	1.26	0.00	Aumentada
K01693: imidazoleglycerol-phosphate dehydratase [EC:4.2.1.19]	1.89	0.00	Aumentada
K02435: aspartyl-tRNA(Asn)/glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit C	1.53	0.00	Aumentada
K03529: chromosome segregation protein	1.42	0.00	Aumentada
K07335: basic membrane protein A and related proteins	1.65	0.00	Aumentada
K17723: dihydropyrimidine dehydrogenase (NAD ⁺) subunit PreA [EC:1.3.1.1]	2.25	0.00	Aumentada
K03087: RNA polymerase nonessential primary-like sigma factor	4.79	0.00	Aumentada
K01613: phosphatidylserine decarboxylase [EC:4.1.1.65]	-0.45	0.00	Reduzida

KEGG ORTHOLOGY (T_DEP_ANS)	LOG2	p.value	Abundância
K00873: pyruvate kinase [EC:2.7.1.40]	-0.60	0.00	Reduzida
K01661: naphthoate synthase [EC:4.1.3.36]	4.01	0.00	Aumentada
K00134: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	1.69	0.00	Aumentada
K06217: phosphate starvation-inducible protein PhoH and related proteins	-0.49	0.00	Reduzida
K00337: NADH-quinone oxidoreductase subunit H [EC:1.6.5.3]	-0.54	0.00	Reduzida
K11191: PTS system, N-acetylmuramic acid-specific IIB component [EC:2.7.1.192]	4.39	0.00	Aumentada
K11192: PTS system, N-acetylmuramic acid-specific IIC component	4.39	0.00	Aumentada
K00865: glycerate 2-kinase [EC:2.7.1.165]	1.29	0.00	Aumentada
K00031: isocitrate dehydrogenase [EC:1.1.1.42]	-0.61	0.00	Reduzida
K02198: cytochrome c-type biogenesis protein CcmF	3.04	0.00	Aumentada
K02835: peptide chain release factor RF-1	0.67	0.00	Aumentada
K07312: putative dimethyl sulfoxide reductase subunit YnfH (DMSO reductase	3.98	0.00	Aumentada
K00059: 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [EC:1.1.1.100]	-0.60	0.00	Reduzida
K00240: succinate dehydrogenase / fumarate reductase, iron-sulfur subunit [EC:1.3.5.1 1.3.5.4]	-0.75	0.00	Reduzida
K00342: NADH-quinone oxidoreductase subunit M [EC:1.6.5.3]	-0.76	0.00	Reduzida

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.9 Termos do pfam diferentemente abundantes no grupo T_DEP e T_DEP_ANS.

pfam (T_DEP)	LOG2	p.value	Abundância
PF01077: Nitrite and sulphite reductase 4Fe-4S domain	0.87	0.00	Aumentada
PF01887: S-adenosyl-l-methionine hydroxide adenosyltransferase	3.44	0.00	Aumentada
PF03460: Nitrite/Sulfite reductase ferredoxin-like half domain	0.88	0.00	Aumentada
PF04447: Protein of unknown function (DUF550)	4.09	0.00	Aumentada
PF08267: Cobalamin-independent synthase, N-terminal domain	1.31	0.00	Aumentada
PF09642: YonK protein	4.24	0.00	Aumentada
PF10054: Predicted periplasmic lipoprotein (DUF2291)	3.49	0.00	Aumentada
PF13411: MerR HTH family regulatory protein	0.35	0.00	Aumentada
PF13946: Domain of unknown function (DUF4214)	3.88	0.00	Aumentada
PF14040: Deoxyribonuclease NucA/NucB	4.68	0.00	Aumentada
PF16729: Domain of unknown function (DUF5067)	1.36	0.00	Aumentada
PF00490: Delta-aminolevulinic acid dehydratase	0.80	0.00	Aumentada
PF00553: Cellulose binding domain	1.25	0.00	Aumentada
PF04443: Acyl-protein synthetase, LuxE	1.40	0.00	Aumentada
PF04679: ATP dependent DNA ligase C terminal region	3.89	0.00	Aumentada

pfam (T_DEP_ANS)	LOG2	p.value	Abundância
PF04466: Phage terminase large subunit	-1.08	0.00	Reduzida
PF08535: KorB domain	-3.09	0.00	Reduzida
PF13514: AAA domain	2.03	0.00	Aumentada
PF14393: Domain of unknown function (DUF4422)	-0.91	0.00	Reduzida
PF16283: Domain of unknown function (DUF4929)	2.21	0.00	Aumentada
PF01389: OmpA-like transmembrane domain	3.25	0.00	Aumentada
PF01591: 6-phosphofructo-2-kinase	1.54	0.00	Aumentada
PF02585: GlcNAc-PI de-N-acetylase	0.39	0.00	Aumentada
PF14258: Domain of unknown function (DUF4350)	0.89	0.00	Aumentada
PF14386: Domain of unknown function (DUF4417)	-1.70	0.00	Reduzida
PF00036: EF hand	1.96	0.05	Aumentada
PF00171: Aldehyde dehydrogenase family	-0.34	0.05	Reduzida
PF00182: Chitinase class I	-3.67	0.04	Reduzida
PF00206: Lyase	0.08	0.05	Aumentada
PF00277: Serum amyloid A protein	-6.36	0.04	Reduzida

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.10 Vias metabólicas diferentemente abundantes no grupo T_DEP e T_DEP_ANS.

Vias Metabólicas (T_DEP)	LOG2	p.value	Abundância
HSERMETANA-PWY: L-methionine biosynthesis III	0.39	0.01	Aumentada
PWY-5101: L-isoleucine biosynthesis II	5.17	0.00	Aumentada
PWY-5188: tetrapyrrole biosynthesis I (from glutamate)	0.80	0.00	Aumentada
PWY-7315: dTDP-N-acetylthomosamine biosynthesis	1.85	0.00	Aumentada
RUMP-PWY: formaldehyde oxidation I	3.99	0.00	Aumentada
PWY-1861: formaldehyde assimilation II (RuMP Cycle)	1.92	0.01	Aumentada
PWY0-1297: superpathway of purine deoxyribonucleosides degradation	1.19	0.01	Aumentada
ASPASN-PWY: superpathway of L-aspartate and L-asparagine biosynthesis	-0.36	0.02	Reduzida
FUCCAT-PWY: fucose degradation	0.74	0.02	Aumentada
GLUCONEO-PWY: gluconeogenesis I	0.24	0.04	Aumentada
GLYCOGENSYNTH-PWY: glycogen biosynthesis I (from ADP-D-Glucose)	0.29	0.03	Aumentada
GOLPDLCAT-PWY: superpathway of glycerol degradation to 1,3-propanediol	1.34	0.04	Aumentada
NONOXIPENT-PWY: pentose phosphate pathway (non-oxidative branch)	0.34	0.02	Aumentada
PRPP-PWY: superpathway of histidine, purine, and pyrimidine biosynthesis	0.53	0.05	Aumentada
PWY-5004: superpathway of L-citrulline metabolism	1.82	0.05	Aumentada
PWY-5030: L-histidine degradation III	-0.44	0.05	Reduzida
PWY-5100: pyruvate fermentation to acetate and lactate II	0.57	0.02	Aumentada
PWY-6147: 6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphate biosynthesis I	-0.35	0.03	Reduzida
PWY-6470: peptidoglycan biosynthesis V (β-lactam resistance)	0.86	0.04	Aumentada
PWY-6471: peptidoglycan biosynthesis IV (Enterococcus faecium)	1.02	0.01	Aumentada
PWY-7196: superpathway of pyrimidine ribonucleosides salvage	0.91	0.02	Aumentada
PWY-7539: 6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphate biosynthesis III	-0.33	0.04	Reduzida
PWY66-409: superpathway of purine nucleotide salvage	0.81	0.05	Aumentada

Vias Metabólicas (T_DEP_ANS)	LOG2	p.value	Abundância
PWY-7316: dTDP-N-acetylvirosamine biosynthesis	2.79	0.00	Aumentada
GALACT-GLUCUROCAT-PWY: superpathway of hexuronide and hexuronate degradation	-0.42	0.04	Reduzida
GALACTUROCAT-PWY: D-galacturonate degradation I	-0.52	0.02	Reduzida
PWY-4984: urea cycle	-0.49	0.03	Reduzida
PWY-5004: superpathway of L-citrulline metabolism	2.09	0.03	Aumentada
PWY-6478: GDP-D-glycero-α-D-manno-heptose biosynthesis	2.17	0.02	Aumentada
PWY-6507: 4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranuronate degradation	-0.56	0.02	Reduzida
PWY-6572: chondroitin sulfate degradation I (bacterial)	1.00	0.05	Aumentada
PWY-7371: 1,4-dihydroxy-6-naphthoate biosynthesis II	1.74	0.05	Aumentada

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).

Anexo 3.11 Vias metabólicas diferentemente abundantes no grupo T_DEP e T_DEP_ANS por categoria.

T_DEP	Abundância Aumentada	Abundância Reduzida	Total	%
Amino Acids Biosynthesis	3	1	4	17.4%
Cofactors, Prosthetic Groups, Electron Carriers Biosynthesis and Vitamin Biosynthesis	1	2	3	13.0%
Carbohydrate Biosynthesis	3	0	3	13.0%
C1 Compounds Utilization and Assimilation	3	0	3	13.0%
Nucleoside and Nucleotide Biosynthesis	2	0	2	8.7%
Carbohydrate Degradation	1	0	1	4.3%
Secondary Metabolite Biosynthesis	1	0	1	4.3%
Carboxylate Degradation	1	0	1	4.3%
Outros	4	1	5	21.7%
	19	4	23	100%

T_DEP_ANS	Abundância Aumentada	Abundância Reduzida	Total	%
Carbohydrate Biosynthesis	2	0	2	22.2%
Amino Acids Biosynthesis	1	0	1	11.1%
Cofactors, Prosthetic Groups, Electron Carriers Biosynthesis and Vitamin Biosynthesis	1	0	1	11.1%
Carbohydrate Degradation	1	0	1	11.1%
Secondary Metabolite Biosynthesis	0	1	1	11.1%
Carboxylate Degradation	0	1	1	11.1%
Inorganic Nutrients Metabolism	0	1	1	11.1%
Outros	0	1	1	11.1%
	5	4	9	100%

Fonte: Desenvolvido pela própria autora (2022).