

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Modulação da Microbiota Intestinal de Ratos Wistar por meio
de Dietas a Base de Óleos das Sementes de Gergelim e
Linhaça Dourada

Natalí Camposano Calças

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Fevereiro - 2018

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Modulação da Microbiota Intestinal de Ratos Wistar por meio
de Dietas a Base de Óleos das Sementes de Gergelim e
Linhaça Dourada

Autora: Natalí Camposano Calças
Orientadora: Prof^a Dra. Alinne Pereira de Castro
Co-orientadora: Prof^a Dra. Rita de Cássia Guimarães

"Dissertação apresentada, como parte
das exigências para obtenção do título
de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA,
no Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Católica
Dom Bosco - Área de concentração:
Biotecnologia Aplicada à Saúde "

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Fevereiro - 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

C141m Calças, Natalí Camposano

Modulação da microbiota intestinal de ratos Wistar por meio de dietas a base de óleos das sementes de gergelim e linhaça dourada / Natalí Camposano Calças; orientadora Alinne Pereira de Castro; coorientadora Rita de Cássia Guimarães. -- 2018

67 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande , 2018.

Inclui bibliografias.

1. Ácidos graxos 2. Microbiota intestinal 3. Biotecnologia 4. Intestinos – Obstruções I. Castro, Alinne Pereira de II. Guimarães, Rita de Cássia III. Título.

CDD: 660.6

Modulação da Microbiota Intestinal de Ratos Wistar por meio de Dietas a Base de Óleos das Sementes de Gergelim e Linhança

Autora: Natalí Camposano Calças

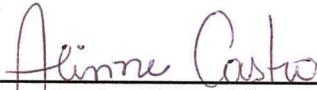
Orientadora: Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro

Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães

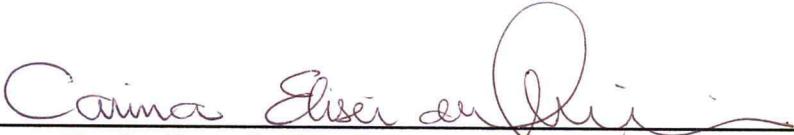
TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

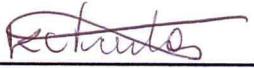
APROVADA em 15 de fevereiro de 2018.



Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro - UCDB
(orientadora)



Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB



Profa. Dra. Karine de Cássia Freitas - UFMS

AGRADECIMENTOS

Incondicionalmente, agradeço a Deus, autor da minha vida, realizador dos meus sonhos impossíveis, por me presentear com este mestrado.

Agradeço a minha família, escolhidos por Deus para me darem amor, carinho, educação e me guiarem pelo caminho correto que desejo seguir eternamente. Por viverem comigo os meus sonhos e sempre apoiarem.

A minha orientadora Prof^a Dra. Alinne Pereira de Castro, pela paciência em me instruir e guiar durante esta jornada. Sua confiança, respeito e amizade durante esses três anos (graduação e pós-graduação) foram essenciais para galgar e conquistar novos horizontes. Que sua luz brilhe sempre.

A minha co-orientadora Prof^a Dra. Rita de Cássia A. Guimarães, por ser uma pessoa presente e sempre prestativa neste processo de aprendizado.

Com carinho a Prof^a Dra. Carina Elisei, por todo apoio e companheirismo dirigidos a mim durante este processo, assim como todo auxílio quando possível no laboratório.

Aos amigos que fui presenteada e se tornaram parte da minha família, por toda paciência, conversa; sei que pude e posso contar com cada um. Nossos dias dentro e fora da instituição de ensino estão eternizados em minha mente e coração.

As técnicas do laboratório SINOVA *Biotch*, por auxiliarem na realização dos experimentos.

Agradeço a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) por dispor um local para realização deste projeto e pelo conhecimento repassado por meio de professores capacitados, assim como agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e proporcionar que me consolide na pós-graduação *stricto sensu*.

A todos que de alguma maneira participaram de modo positivo na minha vida durante esses dois anos, e que fazem com que todo o esforço valha a pena.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. Introdução.....	16
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1 Microbiota intestinal <i>versus</i> dieta.....	17
2.2 Lipídeos.....	21
2.3 Gergelim.....	27
2.4 Linhaça.....	29
3. Objetivos	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4. Materiais e Métodos.....	33
4.1 Animais.....	33
4.2 Dieta.....	34
4.3 Matéria-prima.....	35
4.4 Coleta de material fecal.....	35
4.5 Análise da microbiota intestinal.....	36
4.5.1 Extração de DNA Metagenômico.....	37
4.5.2 PCR do gene 16S rDNA.....	37
4.5.3 Detecção do DNA Metagenômico e amplificação do gene 16S rDNA por eletroforese em gel de agarose.....	38
4.5.4 Sequenciamento do gene 16S rDNA.....	38
4.5.5 Análise dos dados do gene 16S rDNA.....	39

5.	Resultados.....	39
5.1	Análise do DNA Metagenômico.....	39
5.2	Análise do sequenciamento de DNA de alto desempenho.....	42
5.3	Análise da composição da comunidade bacteriana.....	43
6.	Discussão.....	51
7.	Conclusão.....	56
8.	Perspectivas.....	57
9.	Referências.....	57

Anexo 1. Certificado de aprovação da Comissão de ética no uso de animais
(CEUA)

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1:** Superfície da mucosa do intestino com grupos de bactérias diferenciadas por coloração. Fonte: WU e LEWIS (2015).....19
- Figura 2:** Estrutura química dos ácidos graxos poliinsaturados: alfa linolênico (ω -3) e ácido linoleico (ω -6). Fonte: Garófolo e Petrilli (2006).....22
- Figura 3:** Semente de gergelim (*Sesamum indicum L.*) - *Pedaliaceae* (A) e óleo de gergelim (B). Fonte: Figueiredo (2017) (A); Douillard (2016) (B).....27
- Figura 4:** Sementes de linhaça marrom e dourada (*Linum usitatissimum L.*) e óleo de linhaça. Fonte: http://photo.elsoar.com/linseed-with-linseed_oil_pictures.html.....30
- Figura 5:** Delineamento experimental para análises de amostras fecais de ratos Wistar por meio de técnicas metagenômicas.....34
- Figura 6:** Identificação das amostras fecais em tubos de polipropileno, de acordo com o número do animal, sendo estes pertencentes ao grupo L136
- Figura 7:** Esquema metodológico realizado para analisar as amostras fecais de ratos Wistar.....36
- Figura 8:** Gene 16S rDNA desenhado com base na sequência de *E. coli* (Brosius et al., 1981) Marcação em azul – regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco- sequência conservada do Domínio Bactéria. Seta: indicação dos oligonucleotídeos iniciadores da PCR.....37
- Figura 9:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da extração total de DNA fecal dos animais do grupo controle (1, 2 e 3); grupo S1 (4, 5 e 6); grupo L1 (7, 8 e 9); grupo L1.S1: (10, 11 e 12). Seta preta: banda característica de DNA metagenômico. 1 Kb: marcador molecular (Invitrogen®).....40

- Figura 10:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% de fragmentos do gene 16S rDNA de bactérias totais nas amostras do grupo controle (1, 2 e 3). Controle negativo (c-). 1 Kb plus: marcador molecular (Invitrogen®) 41
- Figura 11:** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% de fragmentos do gene 16S rDNA de bactérias totais nas amostras dos grupos S1 (4, 5 e 6); grupo L1 (7, 8 e 9) e grupo L1.S1 (10, 11 e 12). Controle negativo (c-). Kb: marcador molecular (Kasvi®) ..42
- Figura 12:** Gráfico de barras da análise de abundância relativa de filos bacterianos encontrado nas fezes de ratos Wistar.....44
- Figura 13:** Gráfico de barras da análise de abundância relativa de gêneros bacterianos encontrado nas fezes de ratos Wistar.....45
- Figura 14:** Curva de rarefação, estimado pela descrição de OTUs observadas das sequências do gene 16S rDNA.....46
- Figura 15:** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das amostras fecais de ratos Wistar que foram alimentados com diferentes dietas fontes de PUFA. Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade *Unweight UniFrac* não ponderada para a comunidade bacteriana. Diferentes formas geométricas representam as amostras únicas de cada grupo analisado.....47
- Figura 16:** Dendograma da análise de agrupamento com base na distância euclidiana para a comunidade de bactérias. Legenda das amostras: Controle, S1 (óleo de gergelim), L1.S1 ($\frac{1}{2}$ óleo linhaça dourada mais $\frac{1}{2}$ óleo de gergelim) e L1 (óleo de linhaça).....48
- Figura 17:** Diagrama de Venn representando o número de OTUs de bactérias. Os valores representam o número de OTUs compartilhados e não compartilhados entre os grupos controle (azul), óleo de gergelim (rosa), óleo de gergelim mais óleo de linhaça dourada (roxo) e óleo de linhaça (verde) referentes às amostras fecais de ratos Wistar.....48
- Figura 18:** Proporção de abundância relativa referente a comunidade bacteriana dos grupos analisados (controle, S1, L1 e L1.S1). O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de filos bacterianos, a diferença nas proporções médias para cada grupo analisado e por último o p -value indicando se a proporção média é igual para uma determinada amostra.....50

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Composição nutricional da dieta (g/kg) ofertada aos ratos Wistar durante período experimental.....	35
Tabela 2 - Quantificação do DNA total extraído de amostra fecal de cada grupo experimental.....	41
Tabela 3 - Visão geral do resultado final do sequenciamento obtido a partir das amostras fecais dos grupos analisados.....	42
Tabela 4 - Quantidade total de OTUs observadas em cada grupo analisado ao final do sequenciamento do gene 16S rDNA.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido graxo araquidônico
AG	Ácido graxo
ALA	Ácido alfa-linolênico
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DHA	Ácido docosa-hexaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Ácido eicosa-pentaenoico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IAP	Fosfatase alcalina intestinal
KCAL	Quilocaloria
Kb	Kilo pares de bases
Kg	Quilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
mM	Milimolar
M	Molar
NaCl	Clareto de sódio
nm	Nanômetro
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
p/v	Peso por volume
rpm	Rotação por minuto
SFA	Ácido graxo saturado
TGI	Trato gastrointestinal
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal

TBE	Tris/Borato/EDTA
UCDB	Universidade Católica Dom Bosco
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UV	<i>Ultraviolet</i>
v/v	Volume por volume

RESUMO

A microbiota intestinal humana é composta por grande diversidade de micro-organismos, contudo a maior quantidade é formada por bactérias que desempenham diferentes funções no hospedeiro. A composição bacteriana pode ser modificada por fatores genéticos, individuais e ambientais, contudo, o hábito dietético exerce um fator crítico na modulação intestinal. Especificamente, os alimentos fontes de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), exercem resposta inflamatória no hospedeiro decorrente da interação com as bactérias intestinais. Neste contexto, o óleo de linhaça dourada e o óleo de gergelim, ricos em ômega-3 e ômega-6, quando ingeridos, são metabolizados pelas bactérias intestinais em moléculas bioativas que refletem no estado de saúde/doença do hospedeiro. Por esta razão, este estudo objetivou identificar e comparar a comunidade bacteriana presente na microbiota intestinal de ratos Wistar, que consumiram durante 60 dias diferentes dietas contendo 7% de óleos de origem vegetal, fontes de PUFAs. Para tal, os animais foram distribuídos em quatro grupos, sendo eles: Controle (7% gordura animal), S1 (7% óleo de gergelim), L1 (7% óleo de linhaça dourada) e L1.S1 (7% óleo de gergelim mais óleo de linhaça dourada). Para avaliar a comunidade bacteriana, a extração direta de DNA metagenômico foi realizada a partir de amostras fecais, seguido pela amplificação do gene 16S rDNA por reação em cadeia da polimerase (PCR), e posterior sequenciamento de DNA pela plataforma *Illumina HiSeq*. Como resultado, o filo Firmicutes apresentou maior abundância relativa em todos os grupos analisados, seguido pelos filos Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Em nível de gênero, a abundância relativa de *Lactobacillus* foi maior no grupo L1.S1, enquanto que, a abundância relativa de *Blautia* e *Ruminococcus* foi maior nos grupos controle e L1. Vale a pena ressaltar que, houve redução na abundância relativa de *Clostridium* nos grupos L1, S1 e L1.S1. Por sua vez, o grupo L1.S1 apresentou comunidade bacteriana com maior similaridade com o grupo S1, quando comparada com os demais grupos analisados. Diante do exposto, as dietas com óleo origem vegetal, fontes de PUFAs, foram capazes de modular a

microbiota intestinal, principalmente em nível de gênero. Logo, esta pesquisa pode auxiliar frente a nova perspectiva da microbiota intestinal, como alvo terapêutico para diversas doenças, quando associadas a dietas lipídicas de origem vegetal.

Palavras-chave: Ácidos Graxos Poliinsaturados. Comunidade Bacteriana Intestinal. Metagenoma.

ABSTRACT

A human gut microbiota is composed of a huge diversity of micro-organisms, yet a greater amount is formed by bacteria that perform different functions in the host. A bacterial composition can be modified by genetic, individual and environmental factors, however the dietary habit exerts a critical factor in gut modulation. Specifically, food sources of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) exert a inflammatory response in the host resulting from interaction with gut bacteria. In this context, the golden linseed oil and sesame oil, rich in omega 3 and omega 6, when ingested, are metabolized by gut bacteria from bioactive molecules that reflect in the state of health/ disease of the host. For this reason, this study aimed to identify and compare the bacterial community present in the intestinal microbiota of Wistar rats, which consumed for 60 days different diets containing 7% of vegetable oils, PUFA sources. For this, the animals were divided into four groups, being: Control (7% animal fat), S1 (7% sesame oil), L1 (7% golden linseed oil) and L1.S1 (7% sesame oil plus oil of golden linseed). To evaluate the bacterial community, the direct extraction of metagenomic DNA was done from fecal samples, followed by amplification of the 16S rDNA gene by polymerase chain reaction (PCR), and subsequent DNA sequencing by the *Illumina HiSeq* platform. As result, the Firmicutes phylum showed increase in the relative abundance in all groups, following by phyla Bacteroidetes, Proteobacteria and Actinobacteria. At the gender level, the relative abundance of Lactobacillus was higher in the L1.S1 group, while the, relative abundance of Blautia and Ruminococcus was higher in the control and L1 groups. It is worth noting that, there was a decrease in the relative abundance of Clostridium in groups L1, S1 e L1.S1. In turn, the L1.S1 group presented a bacterial community with greater similarity with the S1 group, when compared with the other groups analyzed. In view of the above, the diets with vegetable oil, sources of PUFAs, were able to modulate the gut microbiota, mainly at the gender level. Therefore, this research may help the new perspective of the gut microbiota as a therapeutic target for diseases, when associated with lipid diets of plant origin.

KeyWords: Gut Bacterial Community. Metagenome. Polyunsaturated Fatty Acids.

1. INTRODUÇÃO

Durante a última década o intestino humano se transformou em alvo de estudos, uma vez que é formado por uma população diversa de micro-organismos, incluindo bactérias, vírus e fungos (MARIETTA et al., 2015), contudo, as bactérias constituem a maior densidade neste ambiente em relação aos demais micro-organismos, sendo que os filos Firmicutes e Bacteroidetes representam cerca de 90% de todas as células microbianas intestinais (BELIZÁRIO; NAPOLITANO, 2015).

A composição da microbiota intestinal pode variar de acordo com diversos fatores, tais como genético, idade, gênero, etnia, localização geográfica e dieta do hospedeiro (MARIETA et al., 2015; TOJO et al., 2014). Dentre todos os fatores mencionados acima, capazes de modular a comunidade microbiana intestinal, a dieta se constitui em fator determinante na colonização intestinal, em paralelo com o uso de antibióticos (SALONEN; DE VOS, 2014).

A potencialidade da dieta sobre a microbiota é decorrente do epitélio de revestimento intestinal. Sabe-se que o epitélio intestinal absorve os compostos metabólicos produzidos pelas bactérias intestinais proveniente do nutriente. Por sua vez, os metabólicos bacterianos podem alcançar os sistemas orgânicos ao atravessar a barreira intestinal. Logo, estas interações influenciam no metabolismo do hospedeiro, e de acordo com o estímulo dietético, resultar em maior risco de doenças inflamatórias e metabólicas (CALÇAS et al., 2017).

Neste contexto, salienta-se que os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), ácido graxo linolênico (ômega-3) e ácido graxo linoleico (ômega-6), desempenham importantes funções no organismo, tais como na estrutura das membranas celulares, nos processos metabólicos, além do papel farmacológico, como mediadores de reações inflamatórias, resistência imunológica, distúrbios metabólicos, processos trombóticos e doenças neoplásicas (ROSA et al., 2010).

Os ácidos ômega-6 e ômega-3 são conhecidos como ácidos graxos essenciais, porque os humanos tal como os mamíferos, não podem sintetizá-los e, portanto, precisam obtê-los a partir da dieta (MARTIN et al., 2006). Os alimentos fonte de

PUFAs são tanto de origem vegetal como animal. Contudo, no tocante aos alimentos de origem vegetal, o ômega-6 pode ser sintetizado pelo organismo a partir do consumo de gergelim, girassol, canola, soja, linhaça, milho, algodão (TURATTI, 2012). Por sua vez, o ômega-3 pode ser sintetizado pelo organismo em quantidades relevantes pelo consumo de canola, gergelim, linhaça e soja (LUCAS, 2011).

Ao considerar a resposta inflamatória mediada pelos PUFAs, pressupõe-se que o ômega-6 está associado a efeitos pró-inflamatórios, enquanto que o ômega-3 está envolvido em processos anti-inflamatório (WEYLANDT et al., 2012), devido a síntese de mediadores lipídicos derivados da ativação de vias metabólicas das PUFAS.

Apesar dos recentes avanços científicos quanto a modulação da microbiota intestinal por meio da dieta (HENSCHEL et al., 2018; HU et al., 2017), ainda são escassos os estudos que determinam quais são as bactérias intestinais que estão correlacionadas ao processo inflamatório de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, dislipidemias e síndrome metabólica, quando associadas a dietas lipídicas de fonte vegetal.

Por esta razão, este estudo objetivou identificar e comparar a comunidade bacteriana presente na microbiota intestinal de ratos Wistar, mediante administração de óleo de gergelim e óleo de linhaça dourada, fontes de PUFAs. Com esta informação, espera-se que as novas estratégias de modulação da microbiota intestinal baseadas em alimentos de origem vegetal auxiliem na prevenção e tratamento de doenças multifatoriais que afetam a sociedade moderna.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota intestinal *versus* dieta

O trato gastrointestinal (TGI) humano, que é composto desde a boca até o ânus, é o sítio orgânico mais densamente colonizado por micro-organismos, como vírus, fungos e parasitas, contudo as bactérias são o maior número de espécies de organismos que compõem a microbiota intestinal (MARIETTA et al., 2015).

A microbiota intestinal humana contém um sistema microbiano abundante e heterogêneo, que consiste em pelo menos 100 trilhões (10^{14}) de células microbianas que pesam cerca de 1,5 kg do peso corporal total (FIGURA 1). Este grupo de micro-

organismos é conhecido como microbiota e o conjunto de seus genes é chamado de microbioma (TOJO et al., 2014). Sabe-se ainda que a multiplicidade de bactérias presentes no intestino chega a ser dez vezes maior do que o número de células que formam nosso corpo, assim como contém 100 vezes mais genes do que o hospedeiro, o que determina ser específico para cada organismo (MARCHESI et al., 2016 QIN et al., 2010).

A composição da microbiota intestinal se difere entre os órgãos do TGI, ao longo dos seus aproximadamente 7 metros. No intestino delgado, particularmente no duodeno, há semelhança na microbiota intestinal do estômago, pois o duodeno é a porção inicial do intestino onde chega o quimo, proveniente do estômago, e que tem características ácidas. Contudo, observa-se uma diminuição gradual da acidez do duodeno até ao íleo, e nesta transição, verifica-se um grande número de micro-organismos devido ao aumento da alcalinidade. Por sua vez, o intestino delgado é colonizado com uma diversidade de micro-organismos. Todavia, sem dúvida é no intestino grosso, mais propriamente o cólon, que estão presentes a maioria dos micro-organismos existentes no intestino, devido a fermentação de nutrientes provenientes da digestão dos alimentos pelos micro-organismos (GONÇALVES, 2014).

O processo de colonização do intestino humano começa a partir do nascimento, podendo sofrer alterações na composição microbiana de acordo com o tipo de parto e, por conseguinte, pela história clínica da mãe, a escolha do tipo da amamentação e sua duração, e a exposição aos antibióticos, sendo estes fatores os determinantes críticos iniciais capazes de alterar a comunidade microbiana intestinal (KHORUTS, 2016).

A colonização do trato gastrointestinal ocorre de forma contínua e progressiva ao longo do tempo. Nos jovens adultos verifica-se um predomínio do filo Firmicutes comparativamente aos filos Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. Com o avançar da idade, tende a observar-se uma prevalência superior de Bacteroidetes, porém o número de espécies e diversidade, dentro deste filo, diminui (GONÇALVES, 2014).

Os estudos realizados em adultos, demonstraram que em relação as análises filogenéticas, os filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobactérias, Spiroquetídeo e Verrucomicrobia são os mais predominantes entre as bactérias intestinais (CHAN et al., 2013).

Na última década, os grandes esforços para determinar e compreender a complexidade da comunidade microbiana que reside no intestino, é decorrente das descobertas sobre a relação existente entre os micro-organismos intestinais e seus papéis variados na saúde e doença do hospedeiro, dependendo do tipo e abundância; podendo partir de parceiro simbótico, ou seja, quando há relação benéfica entre os dois organismos, para colonizador patogênico (MARIETTA et al., 2015).

Deste modo, as perturbações na microbiota intestinal, podem acarretar em efeitos negativos, muitas vezes com efeitos tardios, desencadeando mecanismos patogênicos que promovem a inflamação e aumentam a disbiose intestinal (KAMADA et al., 2013). A disbiose intestinal é caracterizada como alteração no equilíbrio microbiano, suscitando em perda de micro-organismos benéficos, crescimento excessivo de micro-organismos potencialmente prejudiciais, e perda de diversidade microbiana global (DEGRUTTOLA et al., 2016). Com base em estudos, acredita-se que as modificações na comunidade microbiana resultam em diversas patologias como, doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (WEST et al., 2015), obesidade, alergias e câncer (TOJO et al., 2014).



Figura 1: Superfície da mucosa do intestino com grupos de bactérias diferenciadas por coloração. Fonte: WU e LEWIS (2015).

Adicionalmente, vários fatores influenciam a composição bacteriana, sendo em parte definidas geneticamente e em outra, modificada por características individuais e ambientais, tais como idade, gênero, etnia, dieta e localização geográfica (MARIETTA et al., 2015; TOJO et al., 2014).

Dentre os moduladores da microbiota intestinal, notavelmente, a dieta tem se destacado por ser considerada um dos principais modificadores externos da

microbiota intestinal no adulto, em paralelo com o uso de medicação (SALONEN; DE VOS, 2014). Embora a maioria das funções microbianas ainda sejam desconhecidas, uma parte substancial desse sistema está envolvida na capacidade de metabolizar e sintetizar moléculas bioativas de origem alimentar (KURASHIMA; KIYONO, 2017; MURTAZA, 2017).

Neste contexto, as bactérias intestinais são responsáveis por sintetizar vitamina K, bem como a maioria das vitaminas do complexo B solúveis em água, como biotina, cobalamina, folatos, ácido nicotínico, ácido pantotênico, piridoxina, riboflavina, tiamina (CALÇAS et al, 2017), além da síntese da bioconversão de xenobióticos, polifenóis e atividade imunomoduladora (NICHOLSON et al., 2012; VIPPERLA; O'KEEFE, 2012).

Já em relação aos macronutrientes, destaca-se o papel da microbiota intestinal na geração de energia para o hospedeiro através da fermentação de componentes dietéticos não digeríveis no intestino grosso, sendo os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) os principais produtos de fermentação do substrato no intestino (TOJO et al., 2014).

Além disso, as bactérias do intestino também estão envolvidas na produção de metabólitos endogenamente derivados de ácidos graxos que são absorvidos no epitélio intestinal e posteriormente, alcançam todos os órgãos do hospedeiro (DRUART et al., 2014). Adicionalmente, e não somente as bactérias, mas todos os micro-organismos que colonizam o intestino podem alterar a expressão gênica em células da mucosa intestinal, alterando a função do TGI e consequentemente, modificando o estado hemodinâmico do hospedeiro (SHEN et al., 2014), e deste modo, o equilíbrio é essencial para prevenção de patologias.

Estas atribuições denotaram ao intestino o termo de “órgão” metabolicamente ativo, que auxilia fisiologicamente na digestão de macro e micronutrientes, além de ser responsável pelo bom funcionamento do sistema imunológico (KURASHIMA; KIYONO, 2017; MURTAZA, 2017) e atuar sobre o sistema nervoso entérico que regula a motilidade intestinal (CALÇAS et al, 2017).

Desse modo, as atividades biológicas dos metabólitos bacterianos liberados em nosso intestino dependem fortemente da dieta e as bactérias intestinais tem um potencial notável para influenciar o estado nutricional, fisiológico e imunológico do hospedeiro, e por conseguinte, papel crucial na mediação dos efeitos alimentares sobre a saúde (SALONEN; DE VOS, 2014; NICHOLSON et al., 2012; VIPPERLA; O'KEEFE, 2012).

Os mais recentes progressos na comunidade científica, frente a interação entre microbiota intestinal e dieta, propuseram o desenvolvimento de propostas de intervenções dietéticas capazes de influenciar na composição da microbiota e em estratégias potencialmente capazes de serem usadas como ferramentas terapêuticas para aliviar e tratar doenças desencadeadas por desequilíbrios microbianos (MOSCHEN et al., 2012).

Segundo Cani e Delzenne (2011), as informações advindas da microbiota intestinal estimulam a novas estratégias terapêuticas, uma vez que alterações específicas na comunidade microbiana do intestino podem neutralizar o desenvolvimento de doenças. Assim, enquanto uma microbiota equilibrada confere benefícios para o hospedeiro, os desequilíbrios microbianos têm sido associados com o aparecimento de doenças relacionadas com distúrbios metabólicos, tais como a dislipidemia, resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 (CAESAR et al., 2010; DIAMANT et al., 2011).

Sendo assim, identificar as bactérias que são afetadas pela dieta, pelos componentes alimentares, pelos padrões dietéticos ou propriamente pelo alimento, determinam informações que podem ser usadas para projetar estratégias alimentares de sucesso para beneficiar a saúde (SALONEN; DE VOS, 2014).

É importante mencionar ainda, que os achados da biodiversidade microbiana presente no intestino humano foram possíveis a partir de técnicas biomoleculares capazes de permitir a identificação e possíveis funções dos micro-organismos intestinais. A metagenômica é uma abordagem biotecnológica para estudar sequências genômicas de micro-organismos que são cultivados diretamente de suas fontes naturais. Por sua vez, para análise da diversidade da microbiota, utiliza-se uma abordagem baseada no gene 16S rDNA, no qual as sequências de DNA obtidas com esta abordagem podem ser implementadas de forma apropriada para identificação bacteriana, por meio de ferramentas de bioinformática (BELIZÁRIO; NAPOLITANO, 2015).

2.2 Lipídeos

Os lipídeos são substâncias caracterizadas pela baixa solubilidade em água e outros solventes polares e alta solubilidade em solventes apolares. As funções dos

lipídeos no organismo englobam composição das membranas celulares juntamente com as proteínas, reservatório energético, isolante térmico, assim como funções especializadas como hormônios e vitaminas, e sinalização intra e intercelular (NELSON; COX, 2014).

Por sua vez, os ácidos graxos são a forma de armazenamento de energia dos lipídeos, embora possam se apresentar livres, comumente encontram-se esterificados sob a forma de triglicerídeos, colesterol e fosfolipídios (SILVA; MURA, 2012).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimento variando de 4 a 36 carbonos (C4 a C36), classificados de acordo com o número de carbonos ou de acordo com a presença ou ausência de ligação entre os carbonos (saturados ou insaturados) (NELSON; COX, 2014).

Em relação ao tamanho da cadeia carbônica, os PUFAS são considerados como ácidos graxos de cadeia longa (18 átomos de carbono) e, insaturado pela presença de duas ou mais ligações entre carbonos. Os PUFAs são divididos em duas grandes famílias, denominada como ômega-3 quando apresenta três insaturações e ômega-6, quando apresenta duas insaturações (FIGURA 2) (HENNEBELLE et al., 2016).

Inseridos nos PUFA, os AG essenciais consistem nos ácidos linoleico (ômega-6) e ácidos linolênico (ômega-3) (APPOLINÁRIO et al., 2014).

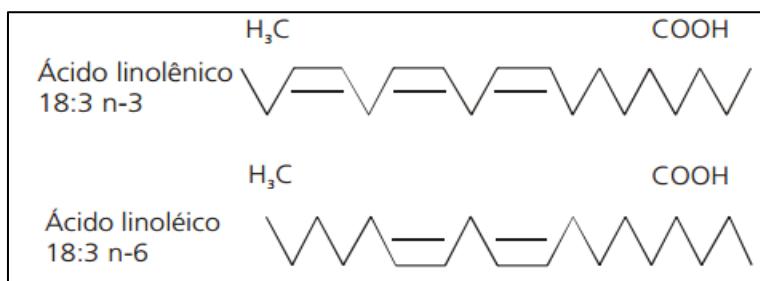


Figura 2: Estrutura química dos ácidos graxos poliinsaturados: alfa linolênico (ω -3) e ácido linoleico (ω -6). Fonte: Garófalo e Petrilli (2006).

Os PUFAs são considerados essenciais uma vez que são obtidos primordialmente por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos linoleico e alfa-linolênico, pela ação de enzimas alongase e dessaturase (MARTIN et al., 2006).

De acordo com Rosa et al. (2010), o ácido linoleico (ômega-6) e ácido linolênico (ômega-3) desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares

e nos processos metabólicos. Além disso, possui grande importância pelo papel farmacológico, como mediadores de reações inflamatórias (relacionados com a conversão enzimática em eicosanoides), resistência imunológica, distúrbios metabólicos, processos trombóticos e doenças neoplásicas.

Devido o ômega-3 e ômega-6 possuírem longa cadeia de PUFA e competirem pelas mesmas enzimas para síntese e metabolismo, suas proporções no tecido do organismo determinam o perfil de mediadores lipídicos envolvidos na resposta inflamatória (KALIANNAN et al., 2015), isto porque, apesar das enzimas terem maior afinidade pelos ácidos graxos da família ômega-3, a conversão do ácido alfa-linolênico é fortemente influenciada pelos níveis dietéticos de ácido linoleico (MARTIN et al., 2006).

Mediante as modificações alimentares, a razão entre o consumo de ômega-3 e ômega-6 modificou-se drasticamente, principalmente nos países industrializados, no qual a convergência da razão entre os AG ômega-6 e ômega-3 que era de 2:1 a 3:1, alterou-se para uma proporção 10:1 a 20:1, com registros de até 50:1 (MARTIN et al., 2006).

O desequilíbrio no consumo de alimentos fonte dessas PUFA pode acarretar em desarranjo metabólico devido aos diferentes metabólitos lipídicos a jusante, e consequentemente, refletir no surgimento de doenças. Diante disso, a proporção atual de dieta recomendada desses dois ácidos gordurosos é de 4:1 (CONSTANTINI et al., 2017; SHEN et al., 2014).

Além de efeitos diretos nas células imunes e mediadoras de inflamação, a ingestão de ácidos graxos pode afetar a imunidade por meio de alterações na microbiota intestinal. Deveras pelo fato da gordura dietética induzir ativação de receptores intestinais relacionados com o processo inflamatório, alterando as funções da membrana celular do sistema imunológico, e acarretando em mudanças na disponibilidade de nutrientes, favorecendo alguns organismos em detrimento de outros (MYLES et al., 2013).

Estudos demonstram que diminuir essa proporção está diretamente relacionada com menor abundância de tromboxanos pró-inflamatórios e prostaglandinas no cólon de ratos Wistar (CAMPOS et al., 2002), prevenção de danos na camada de mucosa intestinal e manifestações de colite inflamatória em ratos Sprague-Dawley e Wistar (TYAGI et al., 2012; CAMPOS et al., 2002), assim como retardamento na incidência de doença inflamatória intestinal (UCHIYAMA et al., 2010).

Destaca-se ainda que em relação as bactérias detectadas na microbiota intestinal, estas produzem metabólitos endogenamente derivados de PUFA e este novo tipo de metabólito pode ser capaz de influenciar a fisiologia do hospedeiro (DRUART et al., 2014).

Estas alterações na microbiota intestinal não só afetam diretamente o hospedeiro, como também sua descendência (MYLES et al., 2014), fato este devido a ligação entre nutrição, processos epigenéticos (por meio da regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios) e desenvolvimento de DCNT na idade adulta, destacando aquelas voltadas a chamada síndrome metabólica, tais como resistência à insulina, diabetes tipo 2, obesidade, dislipidemia e hipertensão (CANINI et al., 2011).

Diante disso, a associação entre o início da vida com a idade adulta, no qual normalmente ocorre uma programação desviante de imunidade tardia e consequente estado geral da saúde é decorrente da composição da microbiota intestinal mediante alimentação no período de recém-nascido (CANINI et al., 2011).

A influência da PUFA na resposta inflamatória geralmente está associada a efeitos anti-inflamatórios quando relacionado ao ômega-3 e a efeitos pró-inflamatórios quando envolve o ômega-6 (WEYLANDT et al., 2012).

O ômega-3, tais como alfa-linolênico, ácido eicosa-pentaenoico (EPA), e ácido docosa-hexaenoico (DHA), demonstraram uma ampla gama de benefícios à saúde, incluindo a melhoria em resultados relacionados com doença cardíaca, diminuição do crescimento e metástase de tumor e modificação favorável na sensibilidade à insulina (GUELZIM et al., 2014; XIE et al., 2016).

Acrescenta-se ainda que o consumo de ômega-3 (PUFA) está relacionado com o tratamento eficaz para doenças inflamatórias (SHAIKH et al., 2012), tais como a aterosclerose e doenças cardiovasculares (CALDER, 2010), assim como doenças inflamatórias do intestino (CALDER, 2009), doenças alérgicas, além de gerar proteção contra o desenvolvimento de doença alérgica e inflamatória em lactentes e crianças (SHEK et al., 2012), auxilia na melhora dos resultados da gravidez (JONES et al., 2013).

A baixa exposição de ômega-3 em “dietas ocidentais” onde predominam os “junk foods” podem contribuir para o aumento da prevalência de doenças inflamatórias; mas, por meio do consumo de ômega-3, Myles et al. (2014) observaram promoção de respostas anti-inflamatórias em modelo murino. Este fato pode estar

relacionado com as células *Tregs* presentes no intestino que aprimoram o ômega-3 dietético e refletem em proteção de doença alérgica e reduzida resposta inflamatória (MYLES et al., 2014).

Além do mais, modificações na microbiota intestinal podem alterar diretamente o desenvolvimento de células *Tregs* (ISSAZADEH-NAVIKAS et al., 2012), que por sua vez, são células regulatórias importantes no controle da autoimunidade atuando através da supressão do sistema imune. Contudo, destaca-se a necessidade de estudos para identificação de bactérias específicas que promovem ou inibem respostas imunológicas exclusivas para elucidar mecanismos que alteram a microbiota intestinal para efeitos terapêuticos (MYLES et al., 2014).

De acordo com Kaliannan et al. (2015), ao analisarem a microbiota intestinal de ratos que receberam transplante fecal, revelaram que o PUFA ômega-3 pode modificar a microbiota intestinal por meio da produção e secreção de fosfatase alcalina intestinal (IAP), levando a uma redução no número de bactérias produtoras de LPS (lipopolissacarídeo), e consequente redução da endotoxemia metabólica e inflamação orgânica.

Dentre as diversas funções dos PUFAs ômega-3 e ômega-6 no organismo, destaca-se manter o equilíbrio das membranas celulares, assim como possui papel fundamental nas funções cerebrais, síntese hormonal e transmissão de impulsos nervosos. Os PUFAs participam ainda da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular (MARTIN et al., 2006).

Todavia, em relação à resposta inflamatória mediada pela família do ômega-6 é fortemente influenciada pelo seu derivado, o ácido graxo araquidônico (AA). O alto consumo de ácido linoleico favorece o aumento do conteúdo de AA nos fosfolipídios das membranas celulares, resultando no aumento da produção de prostaglandina, tromboxano e leucotrienos com perfil pró-inflamatório (GARÓFOLO e PETRILLI, 2006). Ressalta-se ainda que estas alterações orgânicas resultam em um sistema imunológico bem mais ativo que pode contribuir no surgimento de doenças crônicas, como câncer, diabetes, acidente vascular encefálico e doença coronariana (LUSIS et al., 2009).

Segundo Kim et al. (2013), altas quantidades de ácido linoleico foram incorporadas nas dietas ocidentais para substituir os teores do alto consumo de ácidos graxos saturados (SFA), e assim evitar doenças cardiovasculares. Entretanto, o perfil

desfavorável que ocorreu na relação entre ômega-3 e ômega-6 ficou evidente frente a diferença na resposta inflamatória.

Dessa forma, o *Institute of Medicine*, por meio das *Dietary Reference Intakes* (DRIs) estabeleceu níveis de ingestão adequada (AI) de ácidos graxos essenciais baseados na ingestão média da população americana, que consiste em valores de 17 g e 12 g/dia de ácido linoleico e 1,6 g e 1,1 g/dia de ácido linolênico para homens e mulheres, respectivamente (*Institute of Medicine*, 2002).

Estudo realizado com ratos alimentados com uma dieta rica em ácidos graxos ômega-6, foi observado que a endotoxemia metabólica, comumente relacionada com disbiose intestinal, é a principal causa de inflamação crônica de baixo grau, porém que está por trás de muitas doenças crônicas. Por sua vez, a conversão transgênica de tecido gorduroso contendo ômega-6 a ômega-3, reduziu drasticamente o estado de endotoxemia e inflamação (KALIANNAN et al., 2015).

Em relação a composição corpórea na resposta inflamatória, evidencia-se o tecido adiposo pela capacidade de acumular PUFA derivado de metabólitos bacterianos. Isso pode ocorrer por meio de alterações na barreira intestinal causadas por dietas ricas em gorduras e doenças inflamatórias intestinais, que desequilibram o epitélio intestinal e consequentemente, permite a entrada dos metabólitos bacterianos. Estes, quando entram no organismo atingem a corrente sanguínea sistêmica e concentrações maiores do que em condições fisiológicas (DRUART, 2014).

De acordo com Kaliannan et al. (2015), o perfil da microbiota intestinal pode ser determinada pela relação de ômega-3 e ômega-6 no tecido, pois a alta proporção desses PUFA podem aumentar a proporção de produção de LPS (pró-inflamatória) ou diminuir as bactérias supressoras (anti-inflamatória de LPS), sendo que, a redução do índice destes PUFA tem o efeito oposto. Diante das recentes descobertas sobre a interação entre microbiota intestinal, PUFA e os processos inflamatórios, ainda há uma lacuna a ser preenchida se os efeitos orgânicos surgem das interações entre a microbiota intestinal e os componentes dietéticos ou das alterações na composição de PUFA do tecido do hospedeiro.

Todavia, destaca-se que devido ao excesso de alimentos que modulam negativamente a microbiota intestinal e aceleram o processo inflamatório, calcula-se que em 2050 ocorrerão mais de 15 milhões de mortes no mundo em decorrência de DCNTs, e a população brasileira contribuirá de forma significativa para estes dados (ALWAN et al., 2010).

2.3 Gergelim

O gergelim (*Sesamum indicum L.*) é uma espécie de oleaginosa, originária da África, mas é cultivada em todo o mundo (SARKIS, 2014). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2011) a produção mundial foi de 4,092 milhões de toneladas, com uma área plantada de 6,628 milhões de hectares. Em relação a produção de gergelim no Brasil, foram produzidas 16 mil toneladas em uma área de 25 mil hectares em 2005 (FAO, 2011), todavia, o país passou a importar gergelim para atender ao crescente mercado (SARKIS, 2014).

Nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste esta semente é parte do consumo popular da classe de baixa renda, sendo uma importante opção como alternativa para os pequenos e médios produtores (BELTRÃO; VIEIRA, 2002), devido excelente potencial econômico, agronômico e social graças as suas características de tolerância a seca, facilidade de manejo e a obtenção de sementes com elevado teor de óleo e estabilidade química. As sementes de gergelim apresentam tamanho reduzido, forma achata e coloração variando de branco ao preto, e podem ser consumidas *in natura*, todavia a produção de óleo é a principal razão do seu cultivo (FIGURA 3), podendo ser usado nas indústrias alimentares, químicas e farmacêuticas (SARKIS, 2014).



Figura 3: Semente de gergelim (*Sesamum indicum L.*) - Pedaliaceae (A) e óleo de gergelim (B). Fonte: Figueiredo (2017) (A); Douillard (2016) (B).

A composição média da semente contém cerca de 50% de lipídios de excelente qualidade, 20% de proteínas, 60% de carboidratos, fibras 6,30% (MORISE, 2012),

bem como contém elevadas concentrações dos minerais fósforo, potássio, magnésio (IBGE, 2011), cálcio, ferro e cobre, além de compostos fenólicos (fenol, lignanos e flavonóides), aminoácidos não proteicos, cianogenicos, glicosídeos, alcalóides, mucilagem, fosfolípidos, vitaminas B1, B2 e E (TAHA et al., 2014).

É importante salientar que o gergelim é rico em ácidos graxos insaturados, com cerca de 80% de ácidos graxos oleico e linoleico (SARKIS, 2014; CARVALHO et al., 2012). A semente possui ainda menos de 20% de ácidos graxos saturados, entre os quais se destacam os ácidos palmítico e esteárico (SARKIS, 2014).

Destaca-se ainda que o óleo de gergelim possui diversas funções fisiológicas, tais como diminuição dos lipídios plasmáticos e níveis de ácido araquidônico, assim como auxilia na regulação da pressão arterial (ZHANG et al., 2013). Contudo, este óleo é mais conhecido pela atividade antioxidante e biodisponibilidade de gama tocoferol, além de promover função anti-inflamatória e potencial ação estrogênica (ASGARY et al., 2013).

Tais benefícios são decorrentes da presença de frações de lignanas, sesamolina e sesamina e de seus produtos de degradação, como sesamol e sesamolinol, que são potentes antioxidantes. Estes compostos caracterizam a elevada estabilidade química que evita a rancificação e confere ao óleo de gergelim maior resistência a oxidação (ANTONIASSI et al., 2013).

Dentre estes compostos, um dos mais analisados pela comunidade científica é o sesamol, no qual Sharma et al., (2012), observaram que o sesamol (8 mg/kg) foi capaz de atenuar o processo inflamatório em ratos hipercolesterolêmicos por meio da diminuição do estresse oxidativo e resistência insulínica, melhorar a dislipidemia e a esteatose hepática e auxiliar na proteção contra o desenvolvimento da hipertensão.

Outros benefícios observados em ratos hiperlipidêmicos após administração oral de óleo de gergelim foi redução nos níveis de colesterol total sérico e colesterol LDL, e níveis elevados de colesterol HDL (BISWAS et al., 2010). SARKIS (2014), observou ainda que óleo de gergelim reduziu significativamente a expressão de mediadores pró-inflamatórios chave e fatores de estresse oxidativo.

Destaca-se ainda que diante das possibilidades de melhorar esta oleaginosa por meio das novas tecnologias foi realizado o sequenciamento do gergelim, no qual seu genoma foi classificado em 3 grandes categorias: componente celular, função molecular e processo biológico (ZHANG et al., 2013).

Contudo, ainda existem poucas publicações científicas que relacionem o efeito do gergelim ou mesmo seus metabólitos secundários sobre a microbiota intestinal, sendo possível conhecer a composição microbiana e relação com a saúde humana; embora ser suposto que alguns lignanos vegetais, como triglucósido de gergelim, podem ser metabolizados para lignanos de mamíferos na microbiota intestinal, resultando assim em efeitos protetores contra doenças hormonais, como o câncer de mama (ZHANG et al., 2013; JAN et al., 2009).

As complementações dessas informações são de suma importância, pois a característica metabólica das comunidades microbianas reflete nos componentes ingeridos e como transformam-se na forma de sinais e sintomas de determinadas doenças.

2.4 Linhaça

O linho (*Linum usitatissimum* L.) é uma planta pertencente à família das *Lináceas*, sendo sua semente, denominada linhaça, um cereal (monocotiledônea) do grupo das oleaginosas, que se caracteriza por ser chata e oval, com uma extremidade pontiaguda e coloração que varia de marrom-avermelhada a dourado claro (AMIN; THAKUR, 2014), sendo que as duas variedades de cor são decorrentes da quantidade de pigmentos presentes na semente (NOVELLO; POLLONIO, 2011), e ambos são fontes de óleo vegetal (FIGURA 4).

A produção mundial de linhaça encontra-se entre 2.300.000 e 2.500.000 toneladas anuais (NOVELLO; POLLONIO, 2011), sendo o Canadá o maior produtor de linhaças (cerca de 40% da produção mundial), com ênfase na semente dourada, pois a semente desenvolve-se em regiões de clima frio, como por exemplo, o norte dos Estados Unidos (EUA). Já na América do Sul, a maior produtividade se encontra na Argentina, com cerca de 80 toneladas/ano e no Brasil, a produção ainda é baixa, com cerca de 21 toneladas/ano (ALMEIDA et al., 2009).

Destaca-se que no Brasil, existia somente o plantio da variedade de cor marrom-avermelhada e apenas no final de 2006 foi realizada a primeira colheita da variedade dourada (NOVELLO; POLLONIO, 2011; MOLENA-FERNANDES et al., 2010), contudo a cultura convencional ainda é da linhaça marrom pela adaptação ao clima, ao solo e às técnicas de manuseio. (MOLENA-FERNANDES et al., 2010).

A semente de linhaça possui diversas aplicações, como matéria-prima para produção de óleo, farinha e farelos. Isto reflete no benefício do valor econômico, uma vez que a semente *in natura* é utilizada e consumida na alimentação humana e animal, o caule do linho é utilizado para a extração da fibra para a confecção de tecidos e o óleo extraído das sementes, que ainda é a forma mais empregada, sendo utilizado por indústrias do ramo de tintas (NOVELLO; POLLONIO, 2011).



Figura 4: Sementes de linhaça marrom e dourada (*Linum usitatissimum L.*) e óleo linhaça.
Fonte: http://photo.elsoar.com/linseed-with-linseed_oil-pictures.html.

A composição centesimal da semente de linhaça pode variar de 30-40% de lipídios, 20-25% de proteínas, 20-28% de fibras, 4-8% de umidade, 3-4% de cinzas, assim como elevado teor de vitaminas, A, D, E e K (ROTHENBURG; PEREIRA, 2006). Esta oleaginosa apresenta aproximadamente 534 kcal/ 100g, além de elevado teor dos minerais manganês, magnésio, cobre, ferro, zinco e cálcio (DOLSON, 2010).

Quanto a composição lipídica, a linhaça possui baixa concentração de ácidos graxos saturados (9%), uma quantidade moderada de ácidos graxos monoinsaturados (18%) e alto teor de PUFA (73%) (CUPERSMID et al., 2012; TACO, 2006), sendo que desde último, 57% é oriunda de ácidos graxos ômega-3, associado a propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas e antiarrítmicas (FAINTUCH et al., 2007) e 16% ácidos graxos ômega-6 (TACO, 2006). Destaca-se que o percentual de ômega-3 na linhaça é 5,5 vezes maior que em outras fontes alimentares desse ácido graxo, como nozes e canola (ESPESCHIT, 2010).

Em relação a biodisponibilidade de ALA (ácido alfa-linolênico) depende do tipo de linhaça (a ALA tem maior biodisponibilidade no óleo do que nas sementes moídas e possui maior biodisponibilidade em óleo e semente moída do que em sementes inteiras) (GOYAL et al, 2014).

Desta maneira, o óleo de linhaça é uma das melhores fontes vegetais de ácidos graxos ômega-3, sendo que mais da metade dos óleos encontrados na linhaça vêm na forma de ALA (EL-SAYEDA et al., 2014). Para mais, o óleo proporciona uma excelente razão de ácido graxo ômega-6 para ômega-3 de aproximadamente 0,3:1, além de possuir ácidos palmítico e esteárico (GOYAL et al, 2014; PELLIZZON et al., 2007).

Devido a capacidade do ômega-3 em auxiliar na criação de membranas flexíveis nas paredes celulares e na produção de uma substância que ajuda a prevenir a coagulação do sangue, a suplementação com o óleo de linhaça pode ajudar a reduzir o risco de doenças cardiovasculares e derrames (EL-SAYEDA et al., 2014).

O consumo da linhaça que ocorre desde sua descoberta, porém mais incentivado nos últimos anos é decorrente das descobertas sobre as propriedades nutricionais devido sua composição em macro e micronutrientes e em compostos com potencial de bioatividade com diversos benefícios para a saúde associado ao consumo diário dessa semente. Este fato possibilitou a oleaginosa ser considerada como um alimento funcional ou nutracêutico, uma vez que é capaz de prevenir doenças, como doenças cardiovasculares (PRASAD, 2014).

A eficácia da suplementação com óleo de linhaça (40 g/kg) foi observada em biomarcadores de ratos, no qual houve melhora no perfil lipídico, com diminuição nos lipídios totais, triglicérides, colesterol total, LDL e em contrapartida, apresentaram melhora nos valores de HDL e função do fígado e do rim (EL-SAYEDA et al., 2014). Estes benefícios estão correlacionados com os compostos tanto de ação antioxidante, como hipolipidêmicos da oleaginosa (PRASAD, 2014), assim como os fitoquímicos que protegem contra câncer e doenças do coração (AMIN; THAKUR, 2014).

Diante disso, destaca-se a presença de fibra solúvel e insolúvel da semente de linhaça, que ajuda no aumento do volume fecal, melhora o relaxamento do tônus anal e previne a constipação, reduzindo assim o tempo de trânsito intestinal, assim como, auxilia na manutenção dos níveis de glicose no sangue e reduz os níveis de colesterol no sangue (AMIN; THAKUR, 2014). Outro benefício da linhaça é a presença de polissacarídeos que podem reduzir o risco de inúmeras doenças, como lúpus, nefrite,

arteriosclerose e os tipos de câncer dependentes de hormônios (RUBILAR et al., 2010).

Ressalta-se ainda, que a linhaça é a fonte mais rica de lignana, e este componente está intimamente correlacionado com a prevenção do desenvolvimento de câncer através do bloqueio de certas enzimas envolvidas no metabolismo, e consequentemente interfere no aumento e disseminação (metástase) de células cancerígenas (AMIN; THAKUR, 2014). A lignana, especialmente, é oriunda da conversão metabólica de lignina na microbiota intestinal, e assim pode fornecer proteção contra doenças crônicas, câncer e doenças cardíacas (OKARTER et al., 2010).

Embora os dados relatados na literatura sobre a linhaça, sejam sem dúvida de um grão inteiro altamente nutritivo e que atribui diversos benefícios de saúde ao ser humano por meio da sua ingestão, deve-se considerar a presença de compostos antinutricionais na linhaça crua, quando consumida exageradamente, tais como cádmio e cianogênicos (ESPESCHIT, 2010). Em relação ao cádmio, este possui cerca de 0,526 µg por quilo da semente e não deve ultrapassar 1,0 µg/kg/dia, já a média tolerável de cianogênicos é de 12 µg/ kg peso corporal. O efeito do consumo crônico desses compostos pode ser observado no sistema nervoso e diminuição nos níveis de vitamina B12. Todavia, estes compostos podem ser eliminados no cozimento (ESPESCHIT, 2010).

Portanto, diante das expectativas de crescimento populacional e de acordo com as características, funções e aplicações da linhaça e seus subprodutos para o ser humano, houve a necessidade de realizar o sequenciamento desta oleaginosa e assim conhecer as informações contidas no DNA, de modo a compreender as suas funções biológicas e gerar melhoria na qualidade da linhaça (SOTO-CERDA et al., 2014; VENGLAT et al., 2011; FENART et al., 2010).

Em contrapartida, ainda existe a necessidade de estudos caracterizando quais os micro-organismos presentes na microbiota intestinal após o consumo de linhaça, mediante as descobertas relacionando como os metabólitos bacterianos estão envolvidos em processos de saúde/doença, ficando assim evidente que este campo de pesquisa poderá ainda responder a muitas perguntas que continuam sem resposta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e comparar a comunidade bacteriana presente na microbiota intestinal de ratos machos da linhagem Wistar, que consumiram dietas elaboradas de acordo com a AIN-93 contendo diferentes fontes de ácidos graxos poliinsaturados.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a comunidade bacteriana de ratos machos da linhagem Wistar que consumiram dietas de acordo com a AIN-93C contendo 7% de óleo de gergelim;
- ✓ Caracterizar a comunidade bacteriana de ratos machos da linhagem Wistar que consumiram dietas de acordo com a AIN-93C contendo 7% de óleo de linhaça dourada;
- ✓ Caracterizar a comunidade bacteriana de ratos machos da linhagem Wistar que consumiram dietas de acordo com a AIN-93C contendo 7% de óleo de gergelim mais 7% óleo de linhaça;
- ✓ Comparar a comunidade bacteriana dos grupos analisados frente ao grupo controle.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

A pesquisa foi conduzida nas dependências do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), na qual foram utilizados 32 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com idade de 21 dias e com peso médio de $66,87 \pm 6,36$ g.

Durante 60 dias de tratamento os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (3 animais por gaiola), com fornecimento de água *ad libitum*, ambiente controlado ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e mantidos sob um ciclo de claro/ escuro de 12 horas. No período de

coleta de fezes, os animais foram individualizados durante 7 dias e ao final do sétimo dia, as fezes foram coletadas garantindo-se fidedignidade do material. O experimento foi realizado de acordo com os princípios e procedimentos descritos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS sob o protocolo nº 681/2015 (Anexo 1).

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos com 8 animais, de acordo com as respectivas dietas, como observado na figura 5, a seguir:

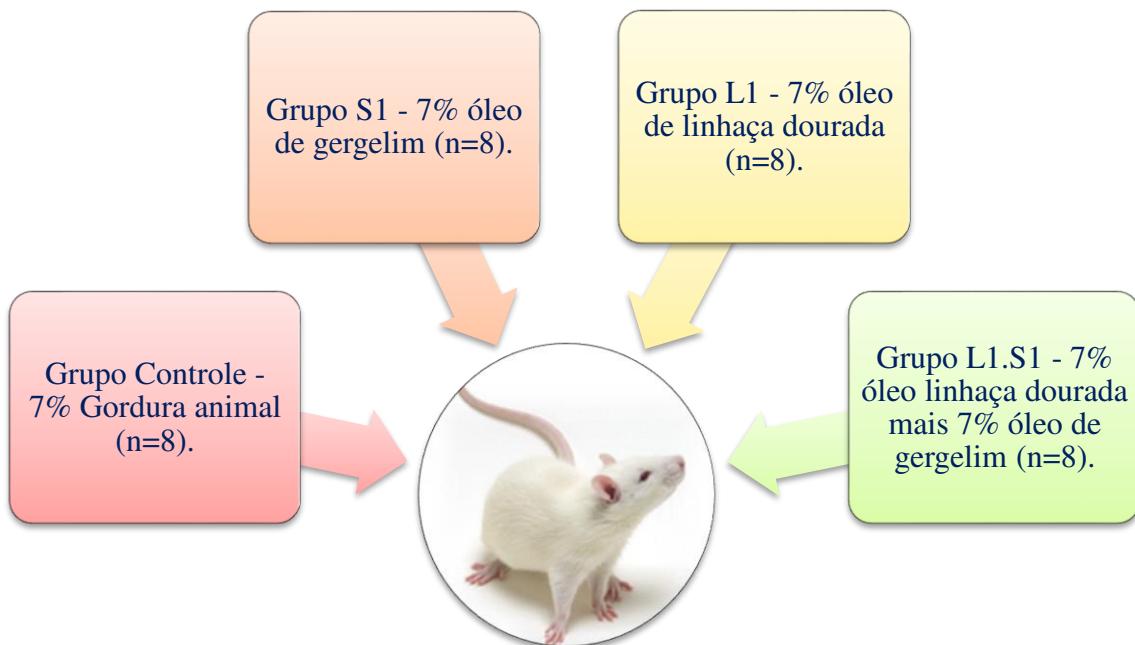


Figura 5: Delineamento experimental para análises de amostras fecais de ratos Wistar por meio de técnicas metagenômicas

4.2 Dieta

Todos os animais dos grupos receberam formulações de dieta de acordo com o *American Institute of Nutrition* (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) (Tabela 1), com modificações nas fontes lipídicas durante 60 dias de tratamento e foram oferecidas aos animais sob forma de *pellets ad libitum*, porém todas as rações foram elaboradas com 7,0g de óleo e/ou gordura por kg de dieta em suas constituições.

Tabela 1 - Composição nutricional da dieta (g/kg) ofertada aos ratos Wistar durante período experimental

Componente da dieta	Quantidade (g)
Amido de milho	397,486
Caseína	200
Amido dextrinizado	132
Sacarose	100
Lipídeos*	70
Celulose	50
Mistura mineral	35
Mistura de vitaminas	10
L-cistina	3
Bitartarato de colina	2,5
Tetrabutil-hidroquinona	0,014

Nota: * Fonte lipídica modificada mediante a característica do grupo. Se óleo de gergelim, óleo de linhaça dourada ou gordura animal.

4.3 Matéria-Prima

No experimento utilizou-se óleos de linhaça dourada e gergelim prensados a frio adquiridos da Pazze Indústria de Alimentos, localizada em Panambi, Rio Grande do Sul, Brasil, para caracterização e inserção nas dietas experimentais. Além de banha de porco Frimesa® para elaboração da dieta do grupo controle com gordura animal.

4.4 Coleta de material fecal

Após 60 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados, e as amostras de fezes coletadas com auxílio de uma espátula e tubo estéril individual. Em seguida, os tubos com amostras foram identificados por número do animal de cada grupo (FIGURA 6), e rapidamente armazenados sob refrigeração em um ultrafreezer a -80°C no Laboratório SINOVA Biotch.



Figura 6: Identificação das amostras fecais em tubos de polipropileno, de acordo com o número do animal, sendo estes pertencentes ao grupo L1.

4.5 Análise da Microbiota Intestinal

As etapas do delineamento experimental realizada no presente estudo estão representadas na figura 7.

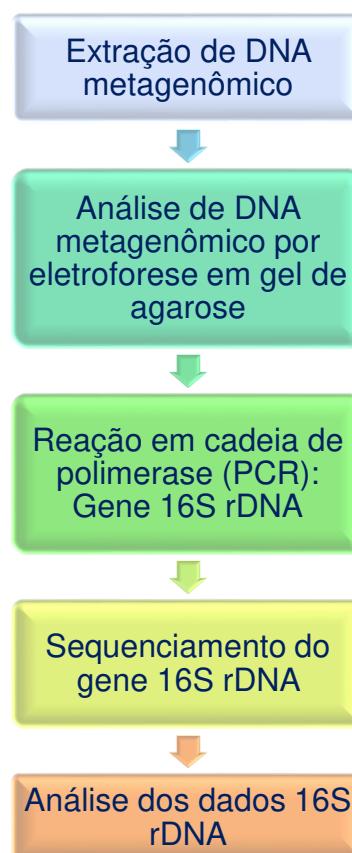


Figura 7: Esquema metodológico realizado para analisar as amostras fecais de ratos Wistar

4.5.1 Extração de DNA Metagenômico

A obtenção do DNA metagenômico foi realizada a partir de 0,125g de fezes, sendo utilizadas amostras de três animais de cada grupo, caracterizando assim análise em triplicata. Ao total, foram analisadas 12 amostras de acordo com o protocolo descrito por Yu; Morrison (2004), com algumas modificações, tais como o peso das fezes, adição de 10 µL de proteínase K, centrifugação em 13.600 rpm, adição de fenol/clorofórmio/álcool isopropílico (25:24:1), adição de solução de precipitação proteica e a retirada do protocolo de acetato de amônia. Por conseguinte, o *pellet* formado de DNA foi ressuspendido em 100 µL de água ultrapura.

O total de DNA extraído das fezes foi quantificado em Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific®), e a qualidade do material genético foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20 °C para posterior amplificação pela PCR.

4.5.2 PCR do gene 16S rDNA

As amostras de DNA metagenômico extraído foram amplificadas pela PCR da região conservada do gene 16S rDNA, utilizando o par de oligonucleotídeos 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') e 1492R (5' TACGGYTACCTTGTACGACTT 3') (FIGURA 8) (HAYASHI et al., 2005).

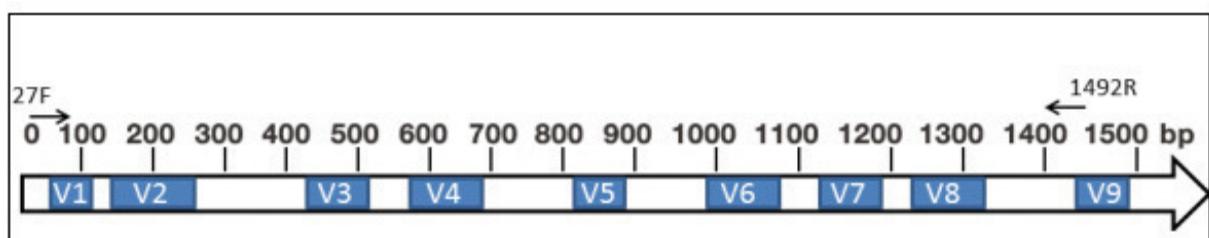


Figura 8: Gene 16S rDNA desenhado com base na sequência de *E. coli* (Brosius et al., 1981) Marcação em azul – regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco- sequência conservada do Domínio Bactéria. Seta: indicação dos oligonucleotídeos iniciadores da PCR.

As amplificações pela PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL. A cada reação de amplificação foram incluídos um controle positivo, previamente testado, e um controle negativo (água ultrapura autoclavada).

As reações de amplificação consistiram de 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 2 µL de tampão 10X da Taq polimerase (Invitrogen®); 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 1,0 µL de DNA extraído.

As condições utilizadas na amplificação pela PCR foram de 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30, 72 °C por 1 min e 40 segundos, seguidos de uma extensão final de 72 °C por 7 minutos e posterior resfriamento a 10 °C. Os produtos da PCR foram armazenados a – 20 °C.

4.5.3 Detecção do DNA Metagenômico e a amplificação do gene 16S rDNA por eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA metagenômico e os fragmentos amplificados pela PCR foram analisados em eletroforese de cuba horizontal. Uma alíquota de 8 µL de cada amostra juntamente com 2 µL de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de glicerol v/v], foi disposta em gel de agarose a 0,8% (p/v), previamente imerso em tampão TBE 1X [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3], a 80 volts.

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 10 minutos, e logo após descorado por 15 minutos em água destilada. A visualização das bandas com perfil de DNA metagenômico e do produto de PCR foi feita sob luz UV e a imagem documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad - Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio RadTM, Hercules, CA, USA).

As dimensões do DNA metagenômico e dos fragmentos amplificados foram comparados a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 1 kb e 1kb plus DNA Ladder, dispostos no gel juntamente com as amostras analisadas.

4.5.4 Sequenciamento do gene 16S rDNA

Para o processo de sequenciamento, foram utilizadas as amostras de DNA, as quais formaram um *pool* com a junção das 3 réplicas biológicas de cada amostra. Deste modo, as análises do presente estudo consistiram em uma amostra de cada

grupo (controle, S1, L1 e L1.S1), que foram enviadas para empresa GenOne Soluções em biotecnologia para o sequenciamento em larga escala de DNA. Dito isso, a amplificação, assim como o sequenciamento das regiões V3-V4 do gene 16S rDNA foi realizada pela plataforma *Illumina HiSeq* (<http://www.genone.com.br/genomica/>).

4.5.5 Análise dos dados do gene 16S rDNA

A análise dos dados subsequentes foi processada usando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). O QIIME é um programa livre baseado em *scripts Python* que permitem a classificação das sequências de 16S rDNA em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) e, usando-as como base para construir árvores filogenéticas, plotar gráficos taxonômicos, construir redes de interação, calcular medidas de alfa e beta diversidade, entre outros (CAPORASO et al., 2010).

Dessa maneira, as OTUs foram definidas por agrupamento a 97%, utilizando como referência o banco de dados de OTUs mais recente do Greengenes com o método Uclust (EDGAR, 2010).

A estrutura geral da comunidade bacteriana de filo e gênero foram analisados utilizando gráfico de abundância relativa. Por sua vez, a alfa diversidade foi analisada por meio de curva de rarefação e observação de OTUs. A análise de beta diversidade foi mensurada pela matriz de distância não ponderadas UniFrac (PCoA), sendo esta utilizada para demonstrar similaridade ou dissimilaridade entre as amostras analisadas (FUKUYAMA et al., 2015).

Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas entre as amostras foram calculados por meio do software STAMP utilizando o Teste exato de Fisher com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,01$) (cobertura nominal de 95%) (PARKS et al., 2010).

5. RESULTADOS

5.1 Análise do DNA Metagenômico

A extração direta de DNA metagenômico foi realizada com sucesso, obtendo-se DNA de alto peso molecular em todos os grupos analisados, sendo visualizado

pela presença de bandas, acima de 12 kb (FIGURA 9).

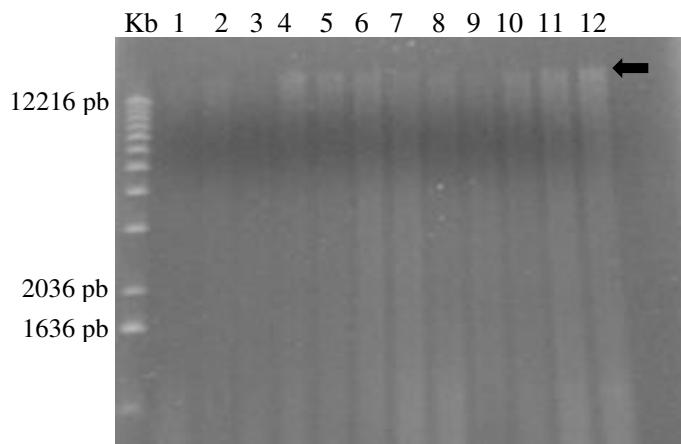


Figura 9: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da extração total de DNA fecal dos animais do grupo controle (1, 2 e 3); grupo S1 (4, 5 e 6); grupo L1 (7, 8 e 9); grupo L1.S1: (10, 11 e 12). Seta preta: banda característica de DNA metagenômico. 1 Kb: marcador molecular (Invitrogen®).

Ao considerar a intensidade das bandas de DNA, observou-se diferença na coloração. Tal resultado corrobora com a quantificação do DNA total extraído (mensurado em nanogramas por microlitros), no qual os grupos analisados obtiveram diferentes concentrações de DNA (TABELA 2). Este processo pode ocorrer pela coloração e intensidade de luz UV no agrupamento de DNA, visto que bandas intensas apresentam maior concentração de DNA e bandas suaves com concentração menor de DNA. A disparidade nas concentrações de DNA entre as amostras variou de 10,8 a 112 ng/ μ L. Já em relação ao método empregado de quantificação, este foi realizado por uma técnica fluorométrica que pode ser usada para validação precisa de DNA em processos a jusante (Life Science, 2014).

Tabela 2 - Quantificação do DNA total extraído de amostra fecal de cada grupo experimental

Grupos	Animais	Quantificação de DNA (ng/ μ L)*
Controle: Gordura animal	1	17,8
	2	21,6
	3	10,9
	4	45,6
S1: Óleo de gergelim	5	75,6
	6	79,8
L1: Óleo de linhaça dourada	7	44,2
	8	19,3
	9	36,0
L1.S1: $\frac{1}{2}$ óleo de linhaça dourada mais $\frac{1}{2}$ óleo de gergelim	10	10,8
	11	81,8
	12	112,0

Nota: * Quantificação realizada em Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) a partir de 1,0 μ L de extração total de DNA fecal de cada amostra.

Uma vez que foi analisada a qualidade e concentração do DNA metagenômico, foi possível aplicar a técnica de PCR para amplificar *in vitro* os fragmentos do gene 16S rDNA de todas as amostras pesquisadas. Para a reação de PCR do presente estudo, foi utilizado 1,0 μ L da diluição: 1,0 μ L (vide TABELA 2) de DNA para 29 μ L de água ultrapura.

Por conseguinte, a utilização de oligonucleotídeos específicos para região 16S rDNA, resultou na amplificação de um fragmento em 1500 pb. Nota-se ainda a diferença na qualidade (FIGURA 10), pureza e intensidade observados no gel de PCR (FIGURA 11), devido à presença de “rastro” e coloração das bandas de PCR.

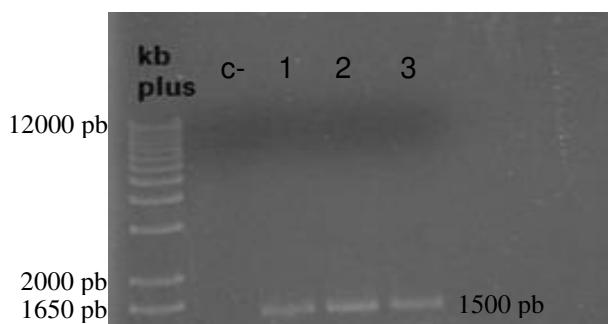


Figura 10: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% de fragmentos do gene 16S rDNA de bactérias totais nas amostras do grupo controle (1, 2 e 3). Controle negativo (c-). 1 Kb plus: marcador molecular (Invitrogen®).

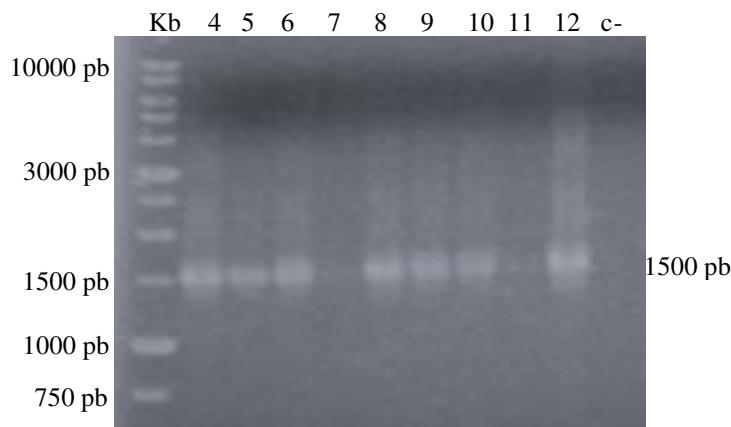


Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% de fragmentos do gene 16S rDNA de bactérias totais nas amostras dos grupos S1 (4, 5 e 6); grupo L1 (7, 8 e 9) e grupo L1.S1 (10, 11 e 12). Controle negativo (c-). Kb: marcador molecular (Kasvi®).

5.2 Análise do sequenciamento de DNA de alto desempenho

A leitura do gene 16S rDNA foi gerada utilizando sequenciamento de alto desempenho, no qual ao total, 313,838 mil sequências de DNA combinadas foram obtidas após os passos de filtros de qualidade para o domínio Bactéria (TABELA 3). Essa análise foi baseada nas sequências de DNA obtidas pelo *pool* de amostras de cada grupo. O total de sequências variou entre 83,414 e 75,79 mil sequências do gene 16S rDNA para o grupo controle e L1.S1, respectivamente.

Tabela 3 - Visão geral do resultado final do sequenciamento obtido a partir das amostras fecais dos grupos analisados

Grupo	Total de sequências do 16S rDNA	Tamanho Mínimo (pb*)	Tamanho Máximo (pb*)	Tamanho Médio (pb*)
Controle	83,414	265	444	410
L1	76,135	288	444	411
S1	78,499	235	441	412
L1.S1	75,79	262	441	415
Total	313,838	262,5**	442,5**	412**

Nota: * pb – pares de base. ** Médias referentes ao tamanho mínimo, máximo e médio do DNA amplificado.

É importante ressaltar ainda, que o total de sequências do DNA nem sempre é proporcional a quantidade de unidades taxonômicas observadas (OTUs). Neste contexto, o grupo S1 apresentou o segundo maior número de sequencias (vide tabela 3), contudo, este não foi equivalente a colocação quanto as OTUs observadas, visto

que apresentou menor OTUs, em comparação aos demais grupos analisados (TABELA 4).

Tabela 4 - Quantidade total de OTUs observadas para cada grupo analisado ao final do sequenciamento do gene 16S rDNA

Amostras	OTUs*
Controle	852.0
L1	711.0
S1	669.0
<u>L1.S1</u>	<u>685.0</u>

Nota*: OTUs: unidades taxonômicas operacionais

5.3 Análise da composição da comunidade bacteriana

A análise dos filos bacterianos demonstrou que Firmicutes apresentou maior abundância relativa em todos os grupos analisados (FIGURA 12), seguido pelos filos Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Os filos Bacteroidetes e Proteobacteria notavelmente, foram mais abundantes nos grupos S1 e L1.S1, quando comparado aos demais grupos analisados. Observou-se ainda, que o grupo S1 apresentou abundância considerável do filo Spirochaetes, contudo demonstrou declínio na abundância relativa do filo Actinobacteria.

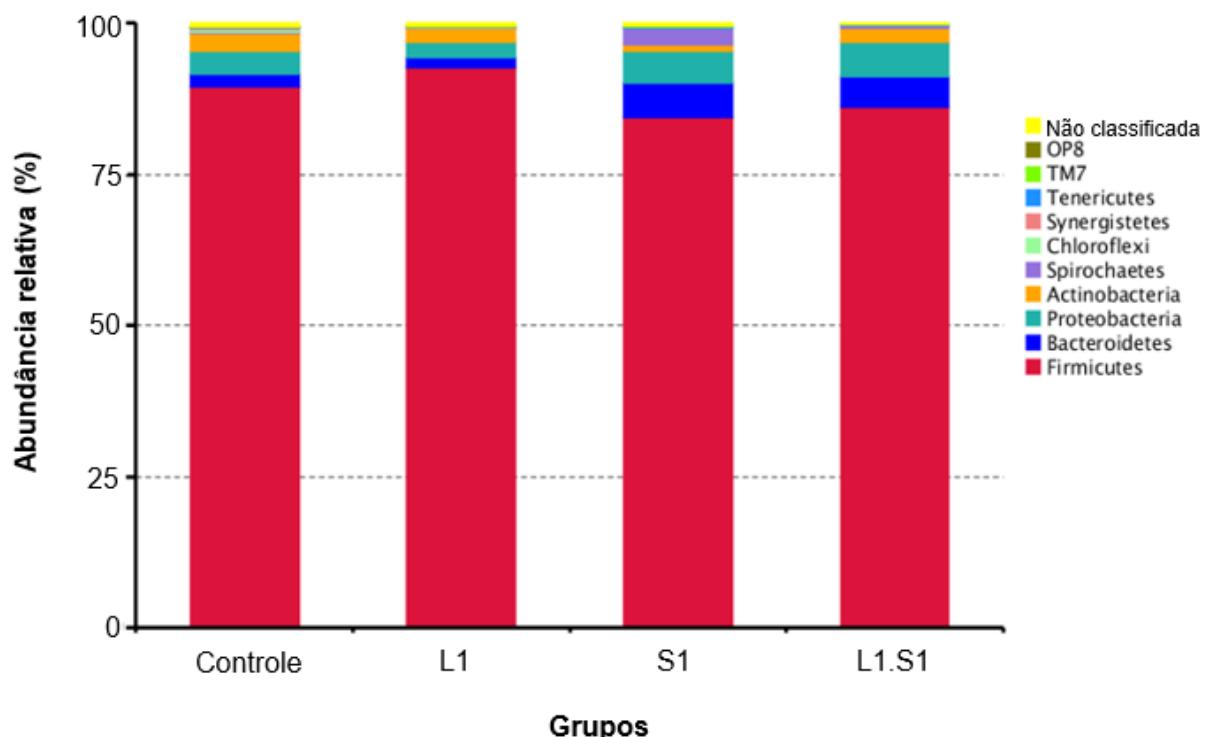


Figura 12: Gráfico de barras da análise de abundância relativa de filos bacterianos encontrado nas fezes de ratos Wistar.

Em relação a comunidade bacteriana à nível de gênero, a heterogeneidade de abundância foi maior entre os grupos. A abundância relativa de *Lactobacillus* foi maior com a junção dos óleos de linhaça mais gergelim (grupo L1.S1). Por sua vez, *Blautia* e *Ruminococcus* obtiveram maior abundância nos grupos controle e L1, contudo apresentaram abundância reduzida de *Oscillospira*, quando comparado aos demais grupos pesquisados. Não menos importante, a abundância relativa de *Treponema* e *Desulfovibrio* foi maior no grupo S1. Os grupos que receberam óleos de origem vegetal obtiveram menor abundância relativa de *Clostridium*, comparado ao grupo controle (FIGURA 13).

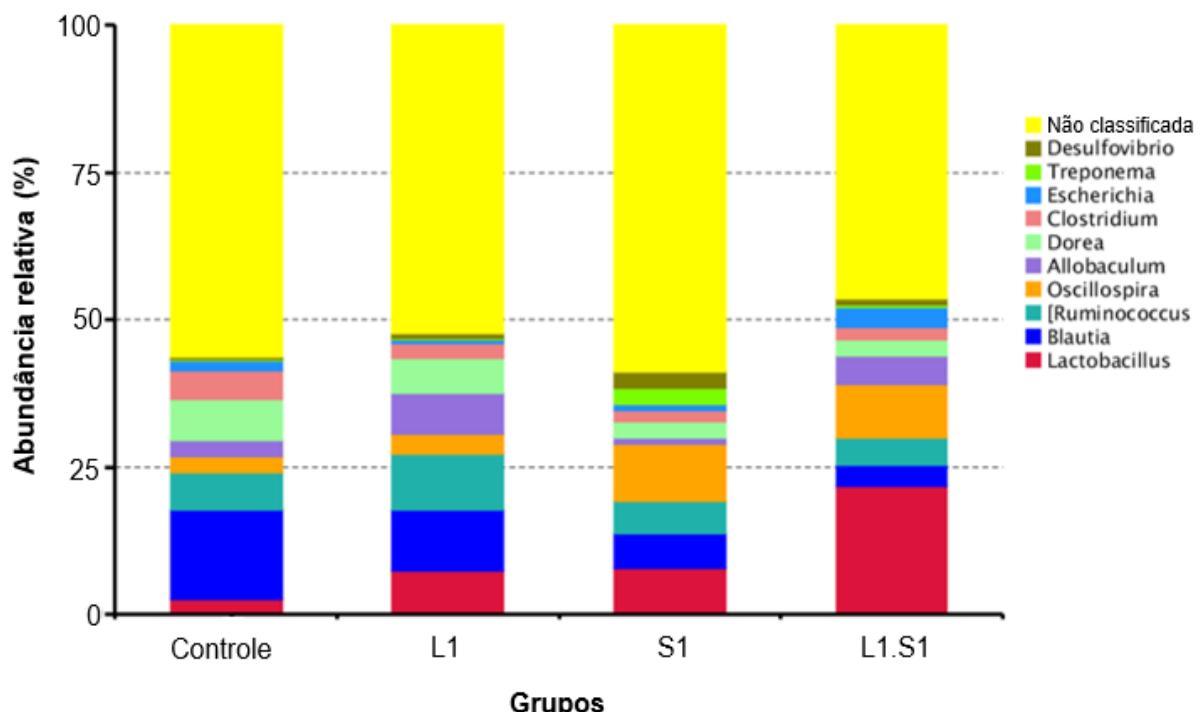


Figura 13: Gráfico de barras da análise de abundância relativa de gêneros bacterianos encontrado nas fezes de ratos Wistar.

Por meio das análises das sequências de DNA, foi possível observar e comparar a composição geral e diferenças relativas na diversidade, tal como análise de alfa e beta diversidade da comunidade bacteriana.

A alfa diversidade, também conhecida como diversidade local, tem como objetivo analisar as amostras individualmente, podendo ser analisada por diferentes métricas de diversidade. Neste contexto, no presente estudo a alfa diversidade foi analisada pela observação de OTUs, por meio da curva de rarefação (FIGURA 14), no qual demonstrou que, houve mudança na mensuração das OTUs entre os grupos no decorrer do sequenciamento. No grupo controle, houve maior riqueza de OTUS, sendo este valor discrepante dos demais grupos pesquisados (L1, S1, L1.S1), ao alcançar 50.000 sequências de DNA.

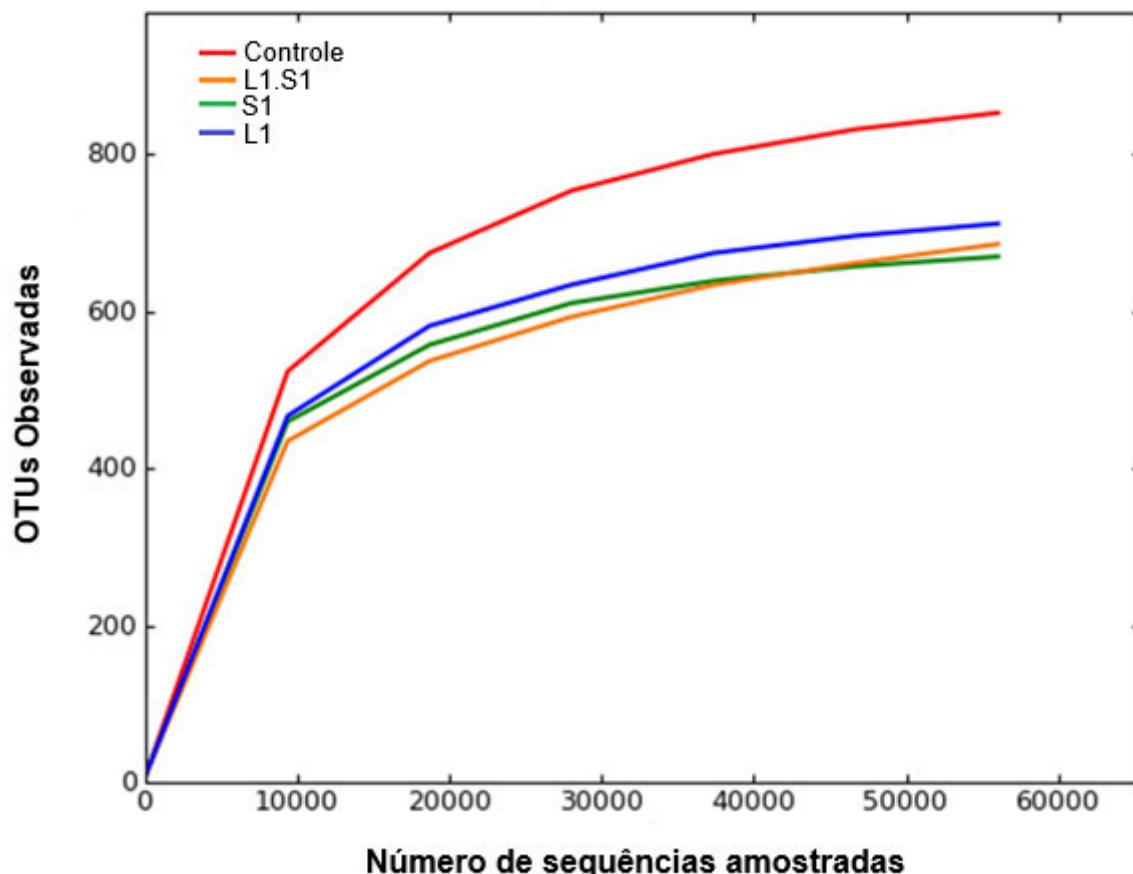


Figura 14: Curva de rarefação, estimado pela descrição de OTU observadas das sequências do gene 16S rDNA.

Por sua vez, através da análise de beta diversidade é possível comparar a diversidade bacteriana entre as amostras. No presente estudo a beta diversidade foi analisada por meio da distância não ponderada, demonstrado em gráfico (análise de coordenadas principais) PCoA (FIGURA 15). Por meio da análise foi possível observar que os grupos L1.S1 e S1 obtiveram similaridade entre suas comunidades bacterianas. Por outro lado, a dieta do grupo L1 induziu uma diferença notória na composição da comunidade bacteriana em comparação com as dietas dos demais grupos (controle, S1 e L1.S1), indicando que o consumo de óleo de linhaça influenciou a comunidade de bactérias intestinais quando comparado aos demais grupos em análise.

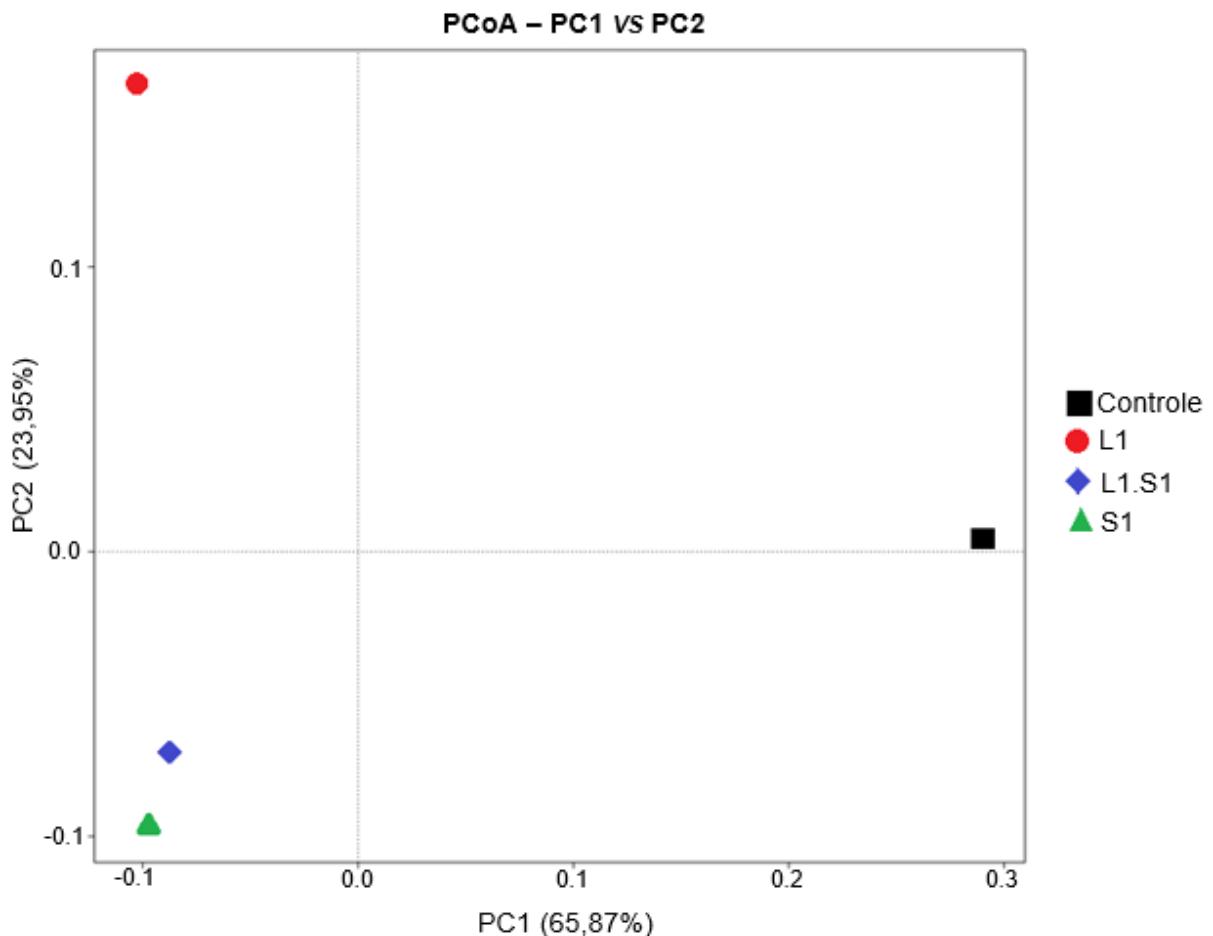


Figura 15: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das amostras fecais de ratos Wistar que foram alimentados com diferentes dietas fontes de PUFA. Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade *Unweight UniFrac* não ponderada para a comunidade bacteriana. Diferentes formas geométricas representam as amostras únicas de cada grupo analisado.

Adicionalmente, a análise do dendograma corroborou com o gráfico de PCoA, visto que a comunidade bacteriana do grupo que recebeu óleo de linhaça mais óleo de gergelim (L1.S1) obteve maior similaridade com o grupo S1, no qual a adição de óleo de gergelim foi determinante para o agrupamento das duas amostras analisadas (FIGURA 16).

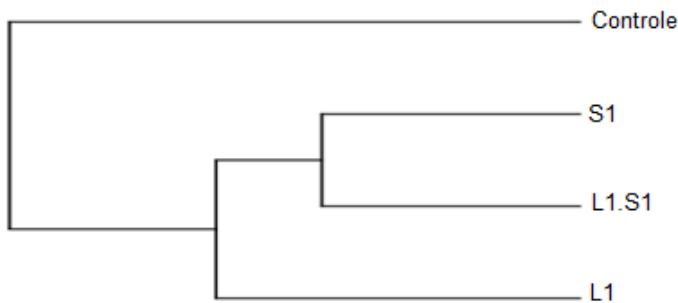


Figura 16: Dendrograma da análise de agrupamento com base na distância euclidiana para a comunidade de bactérias. Legenda das amostras: controle, S1 (óleo de gergelim), L1.S1(½ óleo linhaça dourada mais ½ óleo de gergelim) e L1 (óleo de linhaça).

Com base nos resultados apresentados no diagrama de Venn (FIGURA 17), há uma sobreposição de bactérias entre os grupos analisados (controle, S1, L1, L1.S1), totalizando 484 OTUs, sugerindo que provavelmente essa comunidade bacteriana é mais comumente detectada, sofrendo pouca influência em relação aos óleos de origem vegetal, fonte de PUFAs.

No grupo controle (cor azul) foi possível detectar 204 OTUs não compartilhados, indicando que tais bactérias não foram visualizadas durante as demais dietoterapias analisadas no presente estudo. Em seguida, o grupo L1 (cor verde) não compartilhou 65 OTUs. Em contrapartida, os grupos S1 (cor rosa) e L1.S1 (cor roxo) compartilharam apenas 18 OTUs.

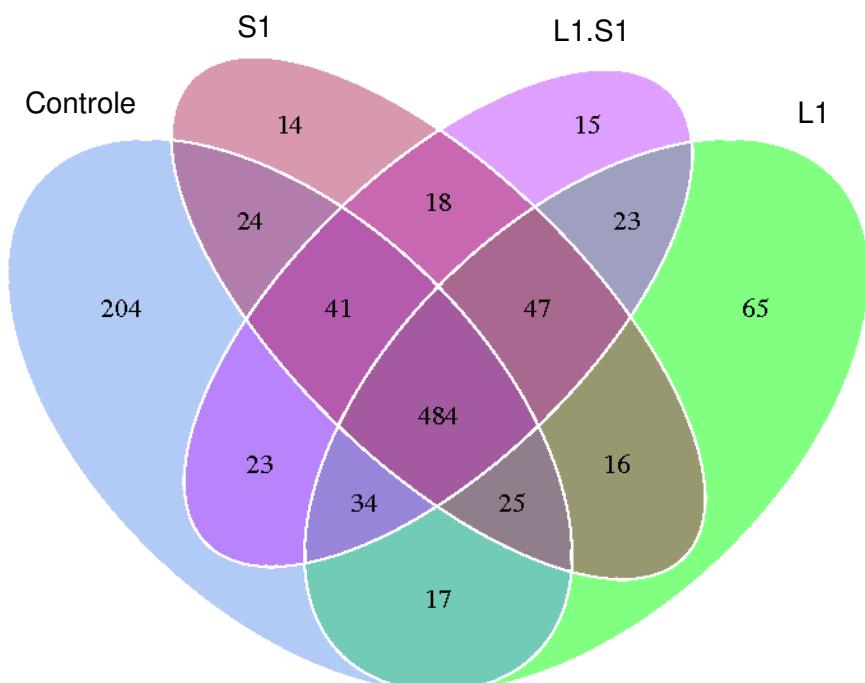


Figura 17: Diagrama de Venn representando o número de OTUs de bactérias. Os valores representam o número de OTUs compartilhados e não compartilhados entre

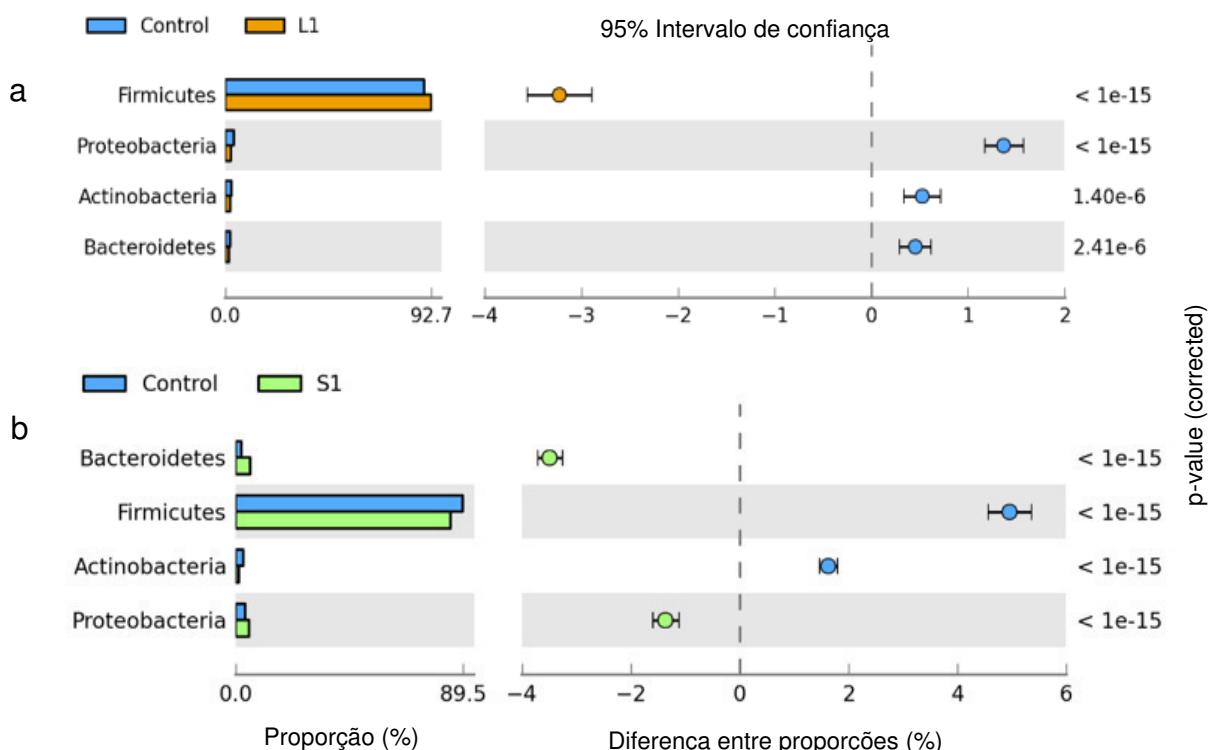
os grupos controle (azul), óleo de gergelim (rosa), óleo de gergelim mais óleo de linhaça dourada (roxo) e óleo de linhaça (verde) referentes às amostras fecais de ratos Wistar.

Dando sequência aos resultados do presente estudo, foi possível detectar diferenças significativas referentes à abundância relativa de filos bacterianos quando considerando ($\alpha = 0.05$) ($p\text{-value} < 0,01$) para as amostras fecais (FIGURA 18).

Neste contexto, o grupo que foi alimentado com óleo de linhaça (L1) obteve uma maior abundância relativa significativa para o filo Firmicutes (FIGURA 18 a, d, e).

Para o filo Actinobacteria houve um aumento em sua abundância relativa, com relevância estatística, apenas no grupo controle quando comparado aos demais grupos (L1, S1, L1.S1) (FIGURA 18 a, b, c). Contudo, quando analisado apenas os grupos que receberam óleo vegetal, o filo Actinobacteria apresentou maior abundância no grupo L1.S1. Destaca-se ainda que, o grupo que recebeu óleo de gergelim (S1), foi o único grupo que representou diferença estatisticamente significante para o filo Spirochaetes (FIGURA 18 f).

É importante ressaltar que novamente os grupos S1 e L1.S1 apresentaram similaridade nos resultados, com relevância estatística, quanto a abundância relativa dos filos Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria (FIGURA 18 b, c).



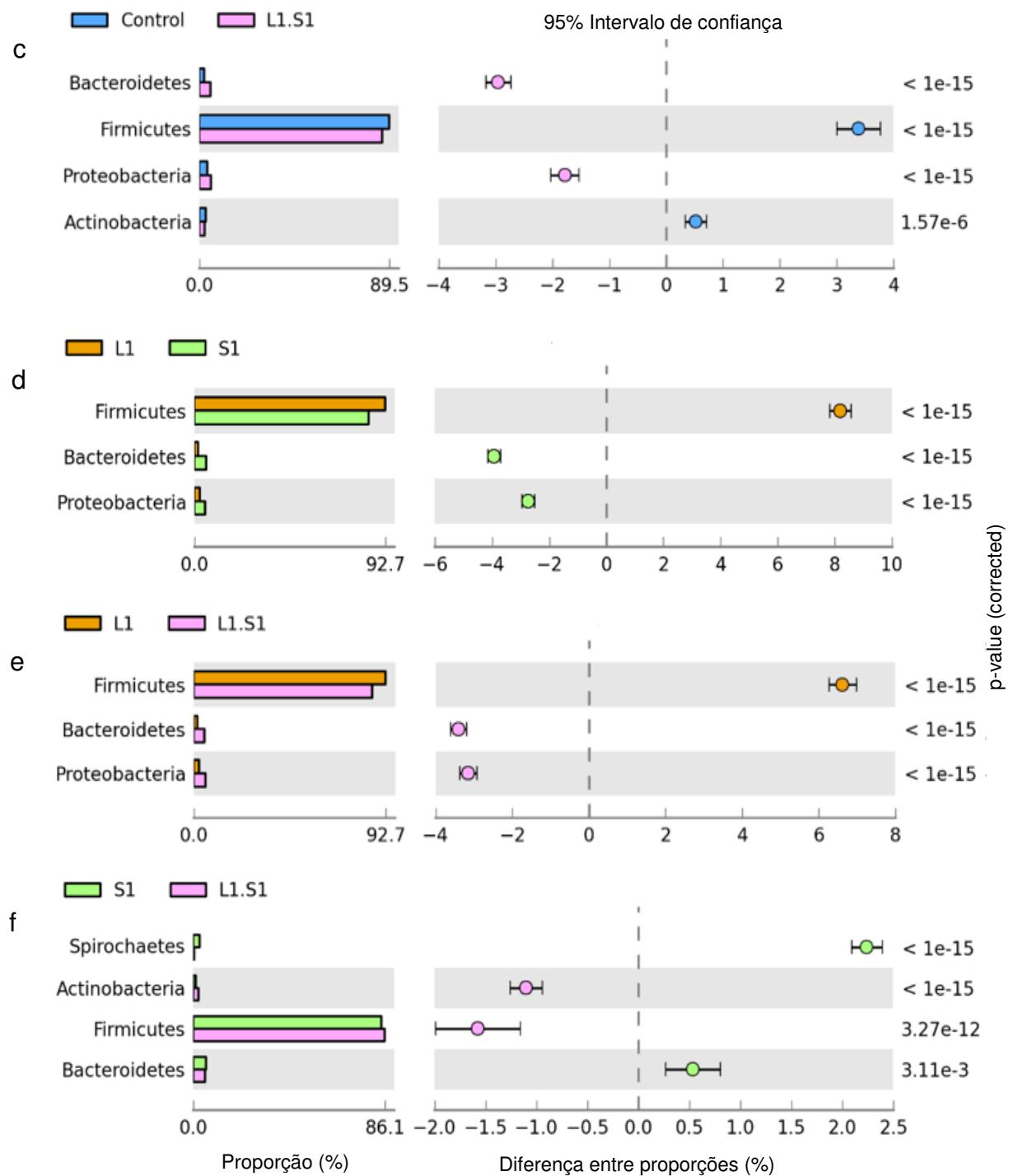


Figura 18: Proporção de abundância relativa referente a comunidade bacteriana dos grupos analisados (controle, S1, L1 e L1.S1). O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de filos bacterianos, a diferença nas proporções médias para cada grupo analisado e por último o p -value indicando se a proporção média é igual para uma determinada amostra.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram apresentados dados sobre a comunidade bacteriana presente em amostras de fezes de ratos Wistar que receberam óleos de origem vegetal, fonte de PUFAs, sendo estes, óleo de gergelim e óleo de linhaça dourada.

Para a investigação desta pesquisa, foram empregados métodos de biologia molecular, tal como análise metagenômica, que possibilita a identificação da comunidade de micro-organismos por técnicas independentes de cultivo, de maneira mais específica e sensível (BARRA et al., 2012), do que as técnicas dependentes de cultivo.

A partir do método de extração do DNA metagenômico, utilizado no presente estudo, pode-se observar a presença do material genético, que, de maneira a jusante, foi um fator determinante na eficiência da PCR e demais procedimentos de metodologia molecular.

As características das amostras nos géis de agarose (FIGURA 10 e 11) pode ocorrer devido a diferentes fatores, tais como: origem da amostra, método de armazenamento e preparo da amostra, degradação do DNA durante procedimento de extração ou mesmo devido a remoção de contaminantes, além da alta heterogeneidade dentro do mesmo genoma. Já em relação as diferentes concentrações de DNA entre as amostras, uma hipótese seja o procedimento de maceração das fezes, responsável pela ruptura da parede celular, e consequente exposição do material genético bacteriano. Neste contexto, uma ruptura incompleta ou parcial das fezes pode resultar em menor rendimento do DNA.

Ao considerar as análises genômicas, geradas por meio do sequenciamento de alto desempenho, foi possível determinar a diversidade da comunidade bacteriana. A diferença no total de sequências brutas de DNA encontradas entre os grupos (TABELA 3), está diretamente relacionada com a composição de nucleotídeos de cada amostra, e consequente identificação de OTUs. Já em relação ao tamanho do fragmento de DNA, naturalmente é esperado que haja uma redução na abrangência do gene pela existência de bases com qualidade inferior, principalmente nas extremidades (REZENDE, 2016). Contudo, para reduzir esse erro, supõe-se que quanto menor o fragmento de DNA, maior será a eficiência na geração de *clusters* e acertos no sequenciamento.

Em adição, o maior número de sequências do gene 16S rDNA, não necessariamente resulta em maior observação de OTUs e vice-versa, visto que a disparidade entre as espécies observadas no grupo controle em relação aos demais grupos analisados (L1, S1, L1.S1), no decorrer do sequenciamento (FIGURA 14), não necessariamente refletiu no total de OTUs (TABELA 4).

Ao considerar os estudos voltados a modulação da microbiota intestinal por meio da dieta, no que tange aos óleos de origem vegetal, principalmente óleo de linhaça e óleo de gergelim, há poucas publicações científicas, sendo os demais estudos voltados a compostos bioativos isolados ou mesmo suplementação com ômega-3 e ômega-6, porém de origem animal. Nesse ponto, os artigos aqui discutidos foram cuidadosamente selecionados para abranger todas as nuances da pesquisa.

Diante disso, sob a análise da composição da comunidade bacteriana em nível de filo (FIGURA 12), foi observada a prevalência na abundância relativa de Firmicutes em todos os grupos analisados. Por outro lado, houve redução de Bacteroidetes e Proteobacterias no grupo controle e L1.

As pesquisas referentes as bactérias intestinais salientam que a comunidade bacteriana pertence a um pequeno número de filos, sendo os mais abundantes: Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria; ao passo que os filos Proteobacteria, Fusobacteria, Cyanobacteria e Verrucomicrobia são geralmente menos abundantes (D'ARGENIO; SALVATORE, 2015).

Dentre os filos mencionados acima, Firmicutes e Bacteroidetes, anaeróbios obrigatórios, em conjunto representam mais de 90% dos filos bacterianos intestinais (BELIZÁRIO; NAPOLITANO, 2015). Contudo, a prevalência e proporção relativa dessas bactérias e demais micro-organismos no intestino, são fortemente dependentes da localização dentro do intestino, assim como a etnia e hábitos alimentares do hospedeiro (NORIEGA et al., 2016; DUDA-CHODAK et al., 2015).

De modo semelhante, a fonte alimentar de PUFAs (ômega-3) pode resultar em diferentes taxas bacterianas. Segundo Constantini et al. (2017), supõe-se que a linhaça tende a diminuir a proporção de Bacteroidetes, enquanto que o ômega-3 de origem animal aparentemente diminui a população de Firmicutes.

O filo Bacteroidetes é composto de bactérias anaeróbicas gram-negativas e sua associação com a alimentação normalmente envolve uma dieta rica em proteína e gordura animal (NORIEGA et al., 2016; RAJILIC'-STOJANOVIC', 2013),

corroborando assim, com a baixa abundância deste filo nos resultados do presente estudo.

A partir de um estudo bem estabelecido que avaliou o efeito da suplementação com 600 mg de ômega-3/dia, foi demonstrado que houve um aumento do filo Firmicutes e, simultaneamente houve redução dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria (NORIEGA et al., 2016).

Por sua vez, ao ser avaliado o efeito da suplementação com óleo de linhaça sobre a microbiota intestinal de ratos com doença hepática alcoólica, foi observado prevalência na abundância de Bacteroidetes, contudo, houve aumento na abundância de Firmicutes (ZHANG et al., 2017).

Adicionalmente, houve redução significativa de Proteobacterias, no qual salienta-se que a administração de óleo de linhaça foi eficiente no processo anti-inflamatório, mesmo nos animais com consumo crônico de álcool, e deste modo, pode atenuar a disbiose intestinal presumivelmente pela modulação das Proteobacterias intestinais (ZHANG et al., 2017). Tal fato é decorrente da evidente associação das Proteobacterias (bactéria gram-negativa) com maior incidência de disbiose intestinal, tanto em humanos como em animais (KIRPICH et al., 2016; MUTLU et al., 2012).

Os achados científicos quanto ao filo Spirochaetes, notavelmente abundante no grupo S1, está intimamente relacionado com a possibilidade de causar doenças humanas (TSINGANOU; GEBBERS, 2010).

No presente estudo, foram observadas variações importantes a nível de gênero, sugerindo que os óleos vegetais, fontes de PUFA's podem afetar a microbiota intestinal com mais intensidade ao nível de gênero, embora aproximadamente 60% dos gêneros sejam pertencentes ao filo Firmicutes.

Neste contexto, a administração da dieta combinada de óleo de linhaça mais óleo de gergelim (L1.S1) induziu o aumento da população de Lactobacillus, todavia houve diminuição de Blautia (FIGURA 14). No tocante aos Lactobacillus, sabe-se que algumas espécies produzem fatores benéficos para manter a função de barreira nas células epiteliais intestinais (KIRPICH et al., 2016).

Em relação a Blautia, seu papel na microbiota intestinal ainda é obscuro, todavia, estudo com camundongos demonstrou que a ingestão de ômega-3 aumentou substancialmente os índices de Blautia (NORIEGA et al, 2016; MYLES et al., 2013). Em contrapartida, houve redução de Blautia em crianças com diabetes tipo I (MURRI et al., 2013), assim como na microbiota associada ao câncer colorretal (CHEN et al.,

2012), demonstrando que este gênero pode desempenhar funções importantes na saúde.

Por conseguinte, *Ruminococcus*, mais abundante no grupo L1, foi associado a uma microbiota intestinal saudável (JANDHYALA et al., 2015) e correlacionado com partículas de alimentos sólidos de farelo de trigo e amido resistente (DE VOS, 2015). Já os achados científicos de *Oscillospira*, mais abundantes nos grupos L1.S1 e S1, demonstraram que sua presença na microbiota intestinal está relacionada a um menor índice de massa corporal, e especula-se que este gênero está envolvido na produção de butirato derivado de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (TIMS et al., 2013).

Destaca-se que o grupo S1 induziu a abundância de *Treponema*, conhecido por conter um conjunto de genes bacterianos para hidrólise de celulose e xilano (DUDA- CHODAK et al., 2015). A presença de *Treponema* na microbiota fecal de crianças rurais da África foi associada a alta ingestão de fibra, maximizando a extração de energia metabólica de polissacarídeos de plantas ingeridas. Estas bactérias podem fermentar tanto xilano como celulose através de enzimas que ativam carboidrato, tais como xilanase, carboximetilcelulase e endoglucanasa (DE FILIPPO et al., 2010).

Em relação ao gênero *Desulfovibrio*, com abundância observada também no grupo S1, ressalta-se à capacidade em gerar moléculas altamente tóxicas de sulfato de hidrogênio (H_2S) como parte de suas vias metabólicas. A superprodução de H_2S tem sido associada à patogênese da colite ulcerativa e do câncer de cólon (EID et al., 2017).

Vale ressaltar ainda a abundância relativa de OTUs não classificadas ao nível de filo e gênero bacteriano no presente estudo (Figura 12-13). Segundo Castro (2011), este fato está relacionado a ausência de sequências de DNA similares depositadas em bancos de dados ou o fato desses organismos nunca terem sidos previamente isolados.

Subsequentemente, após a caracterização taxonômica da comunidade bacteriana, a análise de diversidade alfa evidenciou que após administração dos óleos de origem vegetal houve menor riqueza de OTUs (FIGURA 14), contudo, estes grupos (L1, S1, L1.S1) apresentaram pouca variação de OTUs entre si.

De acordo com à análise de beta diversidade, houve similaridade entre os grupos L1.S1 e S1 (FIGURA 15). Neste contexto, uma hipótese é que a similaridade entre os dois grupos seja decorrente da presença de gergelim, corroborando com o resultado do dendograma (FIGURA 16) e separando os grupos controle e L1.

Já em relação a análise do diagrama de Venn (FIGURA 17), o mesmo foi realizado para exibir e analisar como os OTUs são compartilhados entre as amostras (MONTOYA *et al.*, 2006). Geralmente esse método é utilizado para enfatizar as semelhanças e diferenças entre grandes e complexos conjuntos de dados. Dessa maneira foi possível observar que houve uma sobreposição de bactérias entre os quatro grupos, sugerindo que provavelmente essas bactérias são mais comumente detectadas, sofrendo pouca influência em relação ao óleo vegetais analisados.

É possível que o conjunto destas bactérias sejam cruciais na metabolização de PUFA no intestinal e, por conseguinte, resultar em resposta no hospedeiro. Fato este pode ser evidenciado pelo processo metabólico de AG, que após serem consumidos, são apresentados na forma de triacilglicerol e quando digeridos por lipases, se transformam em monoacilglicerol e ácidos graxos livres. Logo após o processo absorutivo pelas células epiteliais, os AG são reconstituídos em triacilglicerol, incorporados em quilomicrons e, posteriormente, circulam através de vasos linfáticos e juntamente com o sangue. Processo similar ocorre com os PUFA, que após a absorção de ALA, LA e seus metabolitos no intestino, estes voltam a recircular no intestino, sendo capazes de afetar células imunes (KUNISAWA *et al.*, 2015).

Esta relação foi observada por Zhang *et al.* (2017), no qual o ALA dietético derivado de óleo de linhaça serviu como um precursor para síntese de EPA e DHA, além da conversão destas frações no sangue e nos tecidos. Adicionalmente, Hennebelle *et al.*, (2016) observaram que o suplemento de óleo de linhaça rico em ALA ofertado durante 4 meses, propiciou maior ALA e EPA plasmática em adultos mais velhos.

Ao utilizar dieta rica em PUFA (n-3), foi observado papel protetor das células epiteliais do intestino de estímulos pró-inflamatórios (IL-4) de modo a acelerar a recuperação da inflamação, aumentando a resistência epitelial e a integridade da membrana. De modo complementar, a suplementação de ácidos graxos n-3 reduziu a síntese de fosfolípidos derivados de ácidos graxos n-6, resultando assim em diminuição na produção de ácido araquidônico e suas prostaglandinas pró-inflamatórias, derivadas de ciclooxygenase ou lipoxygenase, tromboxanos e leucotrienos (SHEN *et al.*, 2014), metabolitos lipídicos a jusantes capazes de perturbar o sistema imune.

Diante disso, diversos mecanismos foram propostos para atribuir o papel protetor do ômega-3 sobre a inflamação intestinal, como: a) redução do estresse

oxidativo e inflamação mediada por NF-κB em células imunes e intestinais b) supressão dos MAPKs específicos pelo qual os ácidos graxos n-3 bloqueiam ou atenuam a inflamação intestinal c) ativação de GPR120 d) incorporação de PUFA n-3 nas membranas de fosfolipídios do plasma, células imunes ou tecido mucoso intestinal (SHEN et al., 2014).

De modo simultâneo, Sharma et al., (2012) descreveu que o efeito benéfico do sesamol, derivado de gergelim, pode ser atribuído ao aumento da atividade enzimática antioxidante, redução da hs-CRP e diminuição da produção desregulada de adipocitocinas, como TNF- α , IL-6, leptina e adiponectina. Deveras, a diminuição de resistência insulínica e a inflamação pelo sesamol foi em grande parte devido ao aumento da regulação do PPAR γ , resultando assim à supressão de caminhos pró-inflamatórios e, a reversão da hipertensão induzida por dieta com alto teor de gordura, por meio do sesamol foi mediada pela expressão aumentada de e-NOS e pela normalização dos níveis séricos de óxido nítrico (SHARMA et al., 2012), sendo assim um componente eficaz para novas estratégias terapêuticas.

Uma vez que a microbiota intestinal representa uma nova conjectura para modulação terapêutica e prevenção de múltiplas doenças, compreender o impacto das intervenções dietéticas na microbiota intestinal pode ter potenciais implicações clínicas no desenvolvimento de tratamentos direcionados a patologias específicas, incluindo doença cardiometabólica, doenças inflamatórias e cânceres.

Em geral, comparações na composição da comunidade bacteriana frente a estímulos de óleos de linhaça e gergelim não terem sido abordados por meio de técnicas moleculares, os resultados obtidos nesse estudo vêm a contribuir, em nível maior de detalhes, com o conhecimento da caracterização das comunidades bacterianas as duas fontes de PUFA's.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os métodos de biologia molecular utilizados neste presente estudo, principalmente, baseados no sequenciamento do gene 16S rDNA, permitiram identificar e comparar a comunidade bacteriana associada as fezes nos grupos analisados.

De fato, a análise de abundância relativa demonstrou que a prevalência do filo mais abundante não foi modificada mediante aos óleos vegetais, fonte de PUFAs. Contudo, ao nível de gênero, houve clara influência da adição de 7% do óleo de linhaça dourada e óleo de gergelim nas dietas em relação a composição da comunidade bacteriana, sobretudo a capacidade de diminuição na abundância de Clostridium observado nos grupos que receberam dieta a base de óleos de origem vegetal, fonte de PUFAs.

Vale a pena ressaltar que, o consumo de dietas a base de 7% óleo de linhaça e óleo de gergelim, durante 60 dias de análises, influenciou nitidamente na presença de bactérias identificadas por manter a função de barreira nas células epiteliais intestinais. Por sua vez, a maior similaridade entre a comunidade bacteriana dos grupos L1 e L1.S1, seja provavelmente, por fatores determinantes presente no gergelim. Diante do exposto, o consumo de diferentes óleos de origem vegetal, precursor de PUFAs, favorece a população de bactérias gram-positivas.

8. Perspectivas

A importância de identificar as bactérias que colonizam o intestino frente ao consumo de óleos de origem vegetal é decorrente dos produtos metabolizados por esses micro-organismos e a intima relação que existe com o estado de saúde do indivíduo. Mediante a determinação de grupos bacterianos com tal funcionalidade e a rota bioquímica que tange o gene, cientificamente denominada genômica nutricional, pode-se subentender o papel no sistema imune, sistema inflamatório, bem como na saúde mental, visto que existe um eixo entre cérebro-intestino. Diante do exposto, esta pesquisa poderá auxiliar em novas estratégicas terapêuticas, uma vez que existem raros trabalhos científicos que correlacionem o consumo desses óleos vegetais, de fácil acesso e aquisição, a microbiota intestinal e seus metabólicos com as alterações orgânicas que podem desencadear DNCT e demais patologias.

9. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K. C. L.; BOAVENTURA, G. T.; GUZMAN-SILVA, M. A. A linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido α-linolênico na formação de bainha de mielina. Revista Nutrição, v. 22. n. 5. P. 747-754, 2009.

- ALWAN, A.; MACLEAN, D. R.; RILEY, L. M.; D'ESPAIGNET, E. T.; MATHERS, C. D.; STEVENS, G. A.; BETTCHER, D. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *The Lancet*, v. 376, n. 9755, p1861–1868, 2010.
- AMIN, T.; THAKUR, M. *Linum usitatissimum* L. (Flaxseed)—A Multifarious Functional Food. *Online International Interdisciplinary Research Journal*, v. IV, p. 220-238, 2014.
- ANTONIASSI, R.; ARRIEL, N. H. C.; GONÇALVES, E. B.; FREITAS, S. C.; ZANOTTO, D. L.; BIZZO, H. R. Influência das condições de cultivo na composição da semente e do óleo de gergelim. *Rev. Ceres*, v. 60, n.3, p. 301-310, 2013.
- APPOLINÁRIO, P.P.; DEROGIS, P.B.M.C.; YAMAGUTI, T.; MIYAMOTO, S. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico. *Química Nova*, v. 34, n. 8, p. 1409-1416, 2014.
- ASGARY, S.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; NAJAFI, S.; HEIDARIAN, E.; SAHEBKAR, A. Antihyperlipidemic Effects of *Sesamum indicum* L. in Rabbits Fed a High-Fat Diet. *The Scientific World J*, v. 2013, p. 5, 2013.
- BARRA, A. A.; SILVA, A. L.; RENA, C. L.; FURTADO, M. C. V.; FERREIRA, A. B.; NAGEN, M.; FREITAS, F. S. Análise da diversidade da microbiota intestinal de ratos submetidos à ressecção da valva ileocecal e criação de esfíncter artificial. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 39, n. 6, p. 521-528, 2012.
- BELIZÁRIO, J. E.; NAPOLITANO, M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front. Microbiol*, v. 6, n. 1050, p.1-16, 2015.
- BELTRÃO, N. E. M.; VIEIRA, D. J. O agronegócio do gergelim no Brasil. Brasília: Embrapa, 2002.
- BISWAS, A.; DHAR, P.; GHOSH, S. Antihyperlipidemic effect of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate in rats fed a normal and high cholesterol diet. *J Food Sci*, v. 75, p. 274–279, 2010.
- BROSIUS, J.; DULL, T. J.; SLEETER, D. O.; NOLLER, H. F. Gene organization primary structure of a ribosomal rna operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*, v. 148, p. 107-127, 1981.
- CAESAR, R.; FAK, F.; BACKHED, F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. *J Intern Med*, v. 268, p. 320–328, 2010.
- CALÇAS, N.; MENDONÇA, L.; PEREZ, L.; FERREIRA, R.; ELISEI, C.; CASTRO, A. Diet as a Therapy for Gut Dysbacteriosis. *Bio Med Central*, v. 4, n.1, p. 1021, 2017.
- CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*, v. 2, p. 355–374, 2010.

- CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: Relevance to inflammatory bowel diseases. *International Reviews of Immunology*, v.28, p. 506–534, 2009.
- CAMPOS, F.G.; WAITZBERG, D. L.; HABR-GAMA, A.; LOGULLO, A. F.; NORONHA, I. L.; JANCAR, S. et al. Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis. *Br J Nutr* 002;87:S83–8, 2002.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*, v.130, p.202–212, 2011.
- CANINI, R. B.; COSTANZO, M. D.; LEONE, L. BEDOGNI, G.; BRAMBILLA, P.; CIANFARANI, S.; NOBILI, V.; PIETROBELLI, A.; AGOSTONI, C. Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. *Nutrition Research Reviews*, v. 24, p. 198–205, 2011.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PENA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CARVALHO, R. H. R.; GALVÃO, E. L.; BARROS, J. Â. C.; CONCEIÇÃO, M. M.; SOUSA, E. M. B. D. Extraction, fatty acid profile and antioxidant activity of sesame extract (*Sesamum Indicum L.*). *Braz. J.Chem. Eng*, v. 29, p. 409-420, 2012.
- CHAN, Y. K.; ESTAKI, M.; GIBSON, D. L. Clinical consequences of diet-induced dysbiosis. *Ann Nutr Metab*, v. 63. n. 2, p. 028–40, 2013.
- CHEN, W.; LIU, F.; LING, Z.; TONG, X.; XIANG, C. Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. *Plos One*. v. 7, n. 6, p. e39743, 2012.
- COSTANTINI, L.; MOLINARI, R.; FARINON, B.; MERENDINO, N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci*, v. 18, n. 12, p. 2645, 2017.
- CUPERSMID, L.; FRAGA, A. P. R.; ABREU, E. C.; PEREIRA, I. R. O. Linhaça: composição química e efeitos biológicos. *e-Scientia*, v. 5, n. 2, p. 33-40, 2012.
- D'ARGENIO, V.; SALVATORE, F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta*, v. 7; n. 451, p. 97-102 2015.
- DEGRUTTOLA, A. K.; LOW, D.; MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis*, v. 22, n. 5, p. 1137–1150, 2016.
- DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in

shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. PNAS, v.107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.

DE VOS, W. M. Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. Biofilms and Microbiomes, v. 1, p. 15005, 2015.

DIAMANT, M.; BLAAK, E. E.; DE VOS, W. M. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? Obesity Reviews, v. 12, p. 272–281, 2011.

DOLSON, L. Flax Seed: The Low Carb Whole Grain Nutrition, Health Benefits of Flax Seed. 2010.

DOUILLARD, J (2016). Science Backs Ayurvedic Massage with Sesame Oil. Disponível em: < <https://lifespa.com/science-backs-ayurvedic-massage-sesame-oil/>>. Acesso em: 16 de Maio de 2017.

DUDA-CHODAK, A.; TARKO, T.; SATORA, P.; SROKA, P. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. Eur J Nutr, v. 54, p. 325–341, 2015.

DRUART, C.; NEYRINCK, A. M.; VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V.; CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Role of the Lower and Upper Intestine in the Production and Absorption of Gut Microbiota-Derived PUFA Metabolites. PLoS ONE, v. 9, n.1, p. 1-9, 2014.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

EID, H. M.; WRIGHT, M. L; KUMAR, N .V A.; QAWASMED, A.; SHERIF, T.; HASSAN, S.; MOCAN8, A.; NABAVI, S. M.; RASTRELLI11,, L.; ATANASOV, A. G.; HADDAD, P. S. Significance of Microbiota in Obesity and Metabolic Diseases and the Modulatory Potential by Medicinal Plant and Food Ingredients. Front. Pharmacol, v. 8, n. 387, p. 1-29, 2017.

EL-SAYEDA, G. E.; EL-SAHAR.; ABOR, M. M.; ABED EL- RAHMAN. Study on the biological effect of use flaxseed oil as a source of fat on the Biomarkers of experimental rats. Journal of American Science, v. 10, n.3, 2014.

ESPESCHIT, A. C. R. Efeitos da ingestão de farinha integral de linhaça sobre fatores de risco para doenças cônicas não transmissíveis em ratos Wistar adultos. Tese de Mestrado. Universidade de Viçosa, Programa de Pós-graduação em ciências da nutrição. Minas Gerais, Viçosa, 2010.

FAINTUCH, J.; HORIE, L. M.; BARBEIRO, H. V.; BARBEIRO, D. F.; SORIANO, F. G.; ISHIDA, R. K.; CECCONELLO, I. Systemic inflammation in morbidly obese subjects: response to oral supplementation with alpha-linolenic acid. Obes. Surg, v. 17, n. 3, p. 341-347, 2007.

FAO. Faostat (2011). Food and Agricultural Organization of the United States. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 de Abril de 2016.

FENART, S.; NDONG, Y. P. A.; DUARTE, J.; RIVIÈRE, N.; WILMER, J.; WUYTSWINKEL, O. V.; LUCAU, A.; CARIOU, E.; NEUTELINGS, G.; GUTIERREZ, L.; CHABBERT, B.; GUILLOT, X.; TAVERNIER, R.; HAWKINS, S.; THOMASSE, B. Development and validation of a flax (*Linum usitatissimum* L.) gene expression oligo microarray. *BMC Genomics*, v. 11, p. 592, 2010.

FUKUYAMA, J.; MCMURDIE, P. J.; DETHLEFSEN, L.; RELMAN, D. A.; HOLMES, S. Comparisons of distance methods for combining covariates and abundances in microbiome studies. *Pac Symp Biocomput*, v. 2012, p. 213-24, 2015.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Omega-3 and 6 fatty acids balance in inflammatory response in patients with cancer and cachexia. *Rev. Nutr.*, v. 9, n.5, p. 611-621, 2006.

GONÇALVES, M. A. P. Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo. 2014. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto.

GOYAL, A.; SHARMA, V.; UPADHYAY, N.; GILL, S.; SIHAG, M. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J Food Sci Technol*, v. 51, n. 9, p. 1633–1653, 2014.

GUELZIM, N.; HUNEAU, J. F.; MATHÉ, V.; TESSERAUD, S.; MOUROT, J.; SIMON, N.; HERMIER, D. N-3 fatty acids improve body composition and insulin sensitivity during energy restriction in the rat. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, v. 91, n. 5, p. 203–211, 2014.

HAYASHI, H.; TAKAHASHI, R.; NISHI, T.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism, *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, p. 1093-1101, 2005.

HENNEBELLE, M. COURCHESNE-LOYER, A.; ST-PIERRE, V.; VANDENBERGHE, C.; CASTELLANO, C. A.; FORTIER, M. TESSIER, D.; CUNNANE, C. C. Preliminary evaluation of a differential effect of a α -linolenate-rich supplement on ketogenesis and plasma ω -3 fatty acids in young and older adults. *Nutrition*, v. 32, p. 1211–1216, 2016.

HENSCHEL, A. M.; CABRERA, S. M.; KALDUNSKI, M. L.; JIA, S.; GEOFFREY, R.; ROETHLE, M. F.; LAM, V.; CHEN, Y. G.; WANG, X.; SALZMAN, N. H.; HESSNER, M. J. Modulation of the diet and gastrointestinal associated with autoimmune diabetes susceptibility. *PLoS One*, v. 13, n. 1, p.e0190351, 2018.

HU, S.; WANG, L.; JIANG, Z. Dietary Additive Probiotics Modulation of the Intestinal Microbiota. *Protein Pept Lett*, v. 24, n. 5, p. 382-387, 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro. IBGE; 2011.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes (DRIs) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Part 1. Washington (DC): National Academy Press; 2002.

ISSAZADEH-NAVIKAS, S.; TEIMER, R.; BOCKERMANN, R. Influence of dietary components on regulatory T cells. *Mol Med*, v. 18, p. 95–110, 2012.

JAN, K-C.; HWANG, L. S.; HO, C-T. Biotransformation of Sesaminol Triglucoside to Mammalian Lignans by Intestinal Microbiota. *J. Agric. Food Chem*, v. 57, p. 6101–6106, 2009.

JANDHYALA, S. M.; TALUKDAR, R.; SUBRAMANYAM, C.; VUYYURU, H.; SASIKALA, M.; REDDY, D. N. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015 August 7; 21(29): 8787-8803, 2015.

JONES, M. L.; MARK, P. J.; KEELAN, J. A.; BARDEN, A.; MAS, E.; MORI, T. A.; WADDELL, B. J. Maternal dietary omega-3 fatty acid intake increases resolvin and protectin levels in the rat placenta. *Journal of Lipid Research*, v. 54, p. 2247–2254, 2013.

KALIANNAN, K.; WANG, B.; LI, X-Y.; KIM, K-J.; KANG, J. X. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Nature*, DOI: 10.1038/srep11276, 2015.

KAMADA, N.; SEO, S-Y.; CHEN, G. Y.; NÚÑEZ, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, p. 321-335, 2013.

KIM, J.; LI, Y.; WATKINS, B. A. Fat to treat fat:emerging relation ship between dietary PUFA, endocannabinoids, and obesity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v. 10, p. 32–41, 2013.

KIRPICH, I. A.; PETROSINO, J.; AJAMI, N.; FENG, W.; WANG, Y.; LIU, Y.; BEIER, J. I.; BARVE, S. S.; YIN, X.; WEI, X.; ZHANG, X.; MCCLAIN, C. J. Saturated and Unsaturated Dietary Fats Differentially Modulate Ethanol-Induced Changes in Gut Microbiome and Metabolome in a Mouse Model of Alcoholic Liver Disease. *The American Journal of Pathology*, v. 186, n. 4, p. 765-776, 2016.

KHORUTS, A. First microbial encounters. *Nature Medicine*, v. 22, n. 3, 2016.

KUNISAWA, J.; ARITA, M2.; HAYASAKA, T.; HARADA, T.; IWAMOTO, R.; NAGASAWA, R.; SHIKATA, S.; NAGATAKE, T.; SUZUKI, H.; HASHIMOTO, E.; KURASHIMA, Y.; SUZUKI, Y.; ARAI, H.; SETOU, M.; KIYONO, H. Dietary v3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci. Rep*, v. 5, p. 9750, 2015.

KURASHIMA, Y.; KIYONO, H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. *Annu. Rev. Immunol*, v. 35, p. 119–47, 2017.

- LUCAS, L. Flaxseed reduces plasmas cholesterol and atherosclerotic lesion formation in hamsters. *Atherosclerosis*, v.173, n. 2, p. 223-229, 2011.
- LUSIS, A. J.; ATTIE, A. D.; REUE, K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nature*, v. 9, p. 819-30, 2009.
- MARCHESI, J. R.; ADAMS, D. H.; FAVA, F.; HERMES, G. D. A.; HIRSCHFIELD, G. M.; HOLD, G.; QURAISHI, M. N.; KINROSS, J.; SMIDT, H.; TUOHY, K. M.; THOMAS, L. V.; ZOETENDAL, E. G.; HART, A. The gut microbiota and host health: a new clinical Frontier. *Gut*, v.65, p. 330–339, 2016.
- MARIETTA, E.; RISHI, A.; TANEJA, V. Immunogenetic control of the intestinal microbiota. *Immunology*, v. 145, n.3, p. 313-322, 2015.
- MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.*, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.
- MOLENA-FERNANDES, C. A.; SCHIMIDT, G.; NETO-OLIVEIRA, E. R.; BERSANI-AMADO, C. A; CUMAN, R. K. N. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum L.*) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. *Rev. Bras. Pl. Med*, v.12, n.2, p.201-207, 2010.
- MORISE, A. Effects of dietary alpha linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.15, n.1, p.51-61, 2012.
- MOSCHEN, A. R.; WIESER, V.; TILG, H. Dietary factors: major regulators of the gut's microbiota. *Gut Liver*, v.6, p. 411–416, 2012.
- MURRI, M.; LEIVA, I.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; TINAHONES, F. J.; CARDONA, F.; SORIGUER, F.; QUEIPO-ORTUNO, M. I. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case–control study. *BMC Med*, v. 11, n. 46, 2013.
- MURTAZA, N.; CUÍV, P. O.; MORRISON, M. Diet and the Microbiome. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 46, p. 49-60, 2017.
- MUTLU, E. A.; GILLEVET, P. M.; RANGWALA, H.; SIKAROEDI, M.; NAQVI, A.; ENGEN, P. A.; KWASNÝ, M.; LAU, C. K.; KESHAVARZIAN, A. Colonic microbiome is altered in alcoholism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. v. 302, n. 9, p. G966-78, 2012.
- MYLES, I. A.; FONTECILLA, N. M.; JANELSINS, B. M.; VITHAYATHIL, P. J.; SEGRE, J. A.; et al. Parental dietary fat intake alters offspring microbiome and immunity. *J Immunol*, v. 191, p.3200–3209, 2013.

- MYLES, I. A.; PINCUS, N. B.; FONTECILLA, N. M.; DATTA, S. K. Effects of Parental Omega-3 Fatty Acid Intake on Offspring Microbiome and Immunity. *PLOS ONE*, v. 9, p. e87181. 137, 2014.
- NELSON, D. L; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; KINROSS, J.; BURCELIN, R.; GIBSON, G.; et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, v. 336, p. 1262–67. 2012.
- NORIEGA, B. S.; SANCHEZ-GONZALEZ, M. A1.; SALYAKINA, D.; COFFMAN, J. Understanding the Impact of Omega-3 Rich Diet on the Gut Microbiota. *Case Reports in Medicine*, v. 2016, p. 1-6, 2016.
- NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R. Caracterização e propriedades da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) e subprodutos. B. *CEPPA*, v. 29, n. 2, p. 317-330, 2011.
- OKARTER, N.; LIU, R. H. Health benefits of whole grain phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, p. 193–208, 2010.
- PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics*, v. 26, n. 6, p. 715-721, 2010.
- PELLIZZON, M. A.; BILLHEIMER, J. T.; BLOEDON, L. T.; SZAPARY, P. O.; RADER, D. J. Flaxseed Reduces Plasma Cholesterol Levels in Hypercholesterolemic Mouse Models. *J Am Coll Nutr*, v. 26, n. 1, p. 66-75, 2007.
- PRASAD, K. Dietary flax seed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v.132, n.1, p.69-76, 2014.
- QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.
- RAJILIC`-STOJANOVIC`, M.; HEILIG, H. G. H. J.; TIMS, S.; ZOETENDAL, E. G.; DE VOS, W. M. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 4, p. 1146–1159, 2013.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. J. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, p.1939-1951,1993.
- ROSA, D. D.; SALES, R. L.; MORAES, F. L. S.; LOURENÇO, F. C.; NEVES, C. A.; SABARENSE, C. M.; RIBEIRO, S. M. R.; PELUZIO, M. C. G. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 25, n. 3, p. 275- 280, 2010.

ROTHENBURG, H. C.; PEREIRA, F. M. Avaliação dos efeitos da ingestão de semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) em ratos hipercolesterolêmicos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, n.7 p.1-8, 2006.

RUBILAR, M.; GUTIÉRREZ, C.; VERDUGO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J. FLAXSEED AS A SOURCE OF FUNCTIONAL INGREDIENTS. *J. soil sci. plant nutr*, v. 10, p. 3, p. 373 – 377, 2010.

SALONEN, A.; DE VOS, W. M. Impact of Diet on Human Intestinal Microbiota and Health. *Review of Food Science and Technology*, v. 5, p. 239-262, 2014.

SARKIS, J. R. Extração de compostos bioativos de tortas de nozes e sementes e aplicação de tecnologias elétricas no gergelim. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em engenharia química. Porto Alegre, 2014.

SHAIKH, S. R.; JOLLY, C. A.; CHAPKIN, R. S. N-3 Polyunsaturated fatty acids exert immunomodulatory effects on lymphocytes by targeting plasma membrane molecular organization. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 33, p. 46–54, 2012.

SHARMA, A. K.; BHARTI, S.; BHATIA, J.; NEPAL, S.; MALIK, S.; RAY, R.; KUMARI, S.; ARYA, D. S. Sesamol alleviates diet-induced cardiometabolic in rats via up-regulating PPAR γ , PPAR α and e-NOS. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 23, n. 11, p.1482-1489, 2012.

SHEN, S.; GASKINS, H. R.; MCINTOSH, M. K. Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 25, n. 3, p. 270–280, 2014.

SILVA, S. M. C. S.; MURA, J. D. P. Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia. Roca: São Paulo, p. 55-57, 2012.

SOTO-CERDA, B., J.; DUGUID, S.; BOOKER, H.; ROWLAND, G.; DIEDERICHSEN, A.; CLOUTIER, S. Association mapping of seed quality traits using the Canadian flax (*Linum usitatissimum L.*) core collection, *Theor Appl Genet*, v. 127, n.4, p. 881–896, 2014.

SHEK, L. P.; CHONG, M. F-F.; LIM, J. Y.; SOH, S-E.; CHONG, Y-S. Role of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids in infant allergies and respiratory diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, n. 730568, p.1-8, 2012.

TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos. 2 ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, p.113, 2006.

TAHA, N. M.; MANDOUR, A. E. A.; MOHAMED, M. K.; EMARHA, R. T. Effect of Sesame Oil on Serum and Liver Lipid Profile in Hyperlipidemic Rats. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, v. 43, p. 18-25, 2014.

TIMS, S.; DEROM, C.; JONKERS, D. M.; VLIEGTINCK, R.; SARIS, W. H.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M.; ZOETENDAL, E. G. Microbiota conservation

and BMI signatures in adult monozygotic twins. *The ISME Journal*, v. 7, p. 707–717, 2013.

TSINGANOU, E.; GEBBERS, J-O. Human intestinal spirochetosis – a review. *GMS German Medical Science*. v. 8, p. 1-7, 2010.

TOJO, R.; SUAREZ, A.; CLEMENTE, M. G.; DE LOS REYES-GAVILAN, C. G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; RUAS-MADIEDO, P. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol*, v. 20, n. 41, p. 15163-76. 2014.

TURATTI, J. M. Óleos vegetais como fontes de alimentos funcionais. *Óleos e Grãos*, v. 56, p. 20-27, 2012.

TYAGI, A.; KUMAR, U.; REDDY, S.; SANTOSH, V. S.; MOHAMMED, S. B.; EHTESHAM, N. Z. et al. Attenuation of colonic inflammation by partial replacement of dietary linoleic acid with α -linolenic acid in a rat model of inflammatory bowel disease. *Br J Nutr*, v. 108, p. 1612–22, 2012.

UCHIYAMA, K.; NAKAMURA, M.; ODAHARA, S.; KOIDO, S.; KATAHIRA, K.; SHIRAISSI, H et al. N-3 polyunsaturated fatty acid diet therapy for patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, v. 16, n. 10, p.1696–707, 2010.

VENGLAT, P.; XIANG, D.; QIU, S.; STONE, S. L.; TIBICHE, C.; CRAM, D.; ALTING-MEES, M.; NOWAK, J.; CLOUTIER, S.; DEYHOLOS, M.; BEKKAOUI, F.; SHARPE, A.; WANG, E.; ROWLAND, G.; SELVARAJ, G.; DATLA, R.. Gene expression analysis of flax seed development. *BMC Plant Biol*,; v. 11, p. 74, 2011.

VIPPERLA, K.; O'KEEFE, S. J. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutr. Clin. Pract.* v. 27, p. 624–35, 2012.

WEST, C. E.; RENZ, H.; JENMALM, M. C.; KOZYRSKYJ, A. L.; ALLEN, K. J.; VUILLERMIN, P.; PRESCOTT, S. L.; MACKAY, C.; SALMINEN, S.; WONG, G.; SINN, J.; STOKHOLM, J.; BISGAARD, H.; PAWANKAR, R.; NOAKES, P.; KESPER, D.; TILUC, M. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: Associations and potentials for gut microbiota therapies. *J Allergy Clin Immunol*, v. 132, p. 3-13, 2015.

WEYLANDT, K. H.; CHIU, C-Y.; GOMOLKA, B.; WAECHTER, S. F.; WIEDENMANN, B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v. 97, p. 73–82, 2012.

WU, G.; LEWIS, J. The Microbiota, the Microbiome and Dysbiosis: Current Knowledge. *Gastroenterology News Update*. Penn Medicine. 2015. Disponível em: <<https://www.pennmedicine.org/uploads/blogs/gastroenterology-news-update/2015/november/themicrobiota-the-microbiome-and-dysbiosis-current-knowledge>>. Acesso em: 1 de Junho de 2017.

XIE, X.; ZHANG, T.; ZHAO, S.; LI, W.; MA, L.; DING, M.; LIU, Y. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids high fat diet intervention on the synthesis of hepatic high-

density lipoprotein cholesterol in obesity-insulin resistance rats. *Lipids in Health and Disease*, v.15, p. 81, 2016.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, v. 36, n. 5, p. 808-812, 2004.

ZHANG, H.; MIAO, H.; WANG, L.; QU, L.; IU, H.; WANG, Q.; YUE, M. Genome sequencing of the important oilseed crop *Sesamum indicum* L. *Genome Biology*, v. 14, p. 401, 2013.

ZHANG, X.; WANG, H.; YIN, P.; FAN H.; SUN, L.; LIU, Y. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice. *Bio Med Central*, v. 16, n. 44, p. 1-10, 2017.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado “Sementes de gergelim e linhaça na dieta de ratos Wistar: efeito do óleo nos lipídios e séricos e impacto na microbiota e vilosidade intestinal”, Protocolo nº 681/2015 sob a responsabilidade de **Rita de Cássia Avellaneda Guimarães** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em reunião ordinária do dia 26 de maio de 2015.

Vigência do Projeto	01/10/2015 a 06/12/2015
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Números de Animais	56
Peso/Idade	21 dias
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério Central/CCBS/UFMS

Maria Araújo Teixeira
Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 27 de maio de 2015.