



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

GIOVANNA RIELLO BARBOSA CORREIA

PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES PORTADORES  
DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E SUA CORRELAÇÃO COM SINTOMAS DE  
DEPRESSÃO

FORTALEZA

2019

GIOVANNA RIELLO BARBOSA CORREIA

PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES PORTADORES  
DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E SUA CORRELAÇÃO COM SINTOMAS DE  
DEPRESSÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia humana

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C847p Correia, Giovanna Riello Barbosa.  
PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME  
MIELODISPLÁSICA E SUA CORRELAÇÃO COM SINTOMAS DE DEPRESSÃO / Giovanna Riello  
Barbosa Correia. – 2019.  
135 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Danielle Macêdo Gaspar.

1. microbiota intestinal. 2. síndrome mielodisplásica. 3. gene 16S rRNA. 4. depressão. I. Título.

CDD 616.9

---

GIOVANNA RIELLO BARBOSA CORREIA

PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES PORTADORES  
DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E SUA CORRELAÇÃO COM SINTOMAS DE  
DEPRESSÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia humana

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori  
Universidade do Extremo Sul Catarinense (Unesc)

---

Prof. Dr. Fábio Miyajima  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)



Dedico esta tese primeiramente a Deus e  
à minha família, em especial ao meu marido Micarton  
André e à minha filha Íris Riello.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica por disponibilizarem esse espaço de crescimento intelectual e de formação profissional.

Ao Laboratório de Neurofarmacologia, Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (Labbmar), Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) da UFC e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) pelos serviços ofertados, laboratórios de qualidade disponibilizados para a realização dessa pesquisa e pelos profissionais dedicados que os compõem.

À minha orientadora, profa. Danielle Gaspar, por ter me aceitado como orientanda, mesmo após um ano de início do meu doutorado, e por ter confiado esse projeto a mim. Agradeço também pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei, além dos conselhos e direcionamento ofertados. Obrigada pela compreensão que a senhora demonstrou em relação a minha ausência durante os meses que fiquei em casa com a minha filha. Gostaria de dizer também que o amor que a senhora demonstra pelo que faz e a leveza com a qual a senhora coordena tudo são inspiradores.

À banca examinadora, por conceder seu tempo para dividir comigo suas valiosas sugestões e, assim, engrandecer este trabalho. Quero agradecer de modo individual ao Dr Ronald Pinheiro, por permitir que eu o acompanhasse, semanalmente, no ambulatório durante esses anos de trabalho e pelos ensinamentos que me foram, pacientemente, transmitidos. O senhor é um médico por vocação, o que ressaltou ainda mais o significado e a importância deste trabalho. Ao Dr. Fábio Miyajima pelo entusiasmo demonstrado em relação a esta pesquisa e por sempre atender de prontidão os meus questionamentos científicos. À profa. e amiga Débora Castelo Branco, pelas demonstrações de amizade, preocupação e de apoio ao longo dessa etapa.

À profa. Vânia Melo por abrir as portas do Lembiotech para que eu realizasse toda a etapa prévia ao sequenciamento. Obrigada por todo o direcionamento, investimento, apoio moral e intelectual que a senhora me ofertou no momento em que mais precisei. Aos profissionais que fazem parte do Lembiotech, pelo acolhimento e ajuda prestados.

À minha “equipe de sequenciamento”, profa. Denise Hissa, Felipe Monteiro, Luina Benevides, pela parceria e carinho que vocês tiveram comigo durante todo o processo. Naquele período, com a minha “estagiária involuntária” (minha filha Íris) na barriga, eu não teria finalizado os experimentos se não fosse pela ajuda de vocês. Em especial, à Andréa Oliveira, por ser minha dupla dinâmica, pelo apoio emocional, por diversas vezes substituir minhas mãos cansadas e por ter tornado tudo mais leve para mim. Sua prova de amizade foi um dos maiores presentes do doutorado.

Ao bolsista de iniciação científica Ícaro Angelus, por ter aceitado ser monopolizado por mim e por ter me ajudado durante todas as etapas experimentais deste trabalho.

À psicóloga Monique Braz pelo acompanhamento e orientações prestados.

À nutricionista Priscila Mendonça pelas avaliações nutricionais realizadas, pela boa vontade em ajudar, por suprir minhas limitações na parte clínica e pela parceria ao longo deste projeto.

À empresa EUREKA omics, mais precisamente, ao Leonardo Normar pelas análises estatísticas e de bioinformática realizadas com primor.

Aos amigos que fiz nos laboratórios de Neurofarmacologia, Labbmar e Citogenômica do Câncer, que me auxiliaram no que foi preciso e tornaram meus dias mais leves e descontraídos. Em especial à Camila Nayane, Manoel, Germana, Caren, Greicy, Aline, Taciana, Tatiane, Nayana, Adriana, Rafaela, Alexia, Felipe, Camila Roque, Thaís, Katharine, Kayanny, Daniela, Roberta, Howard, Gabriel, Wesley e Germana.

À minha colega de trabalho Máisa Viana pela ajuda concedida e por compreender minha ausência durante esta etapa final do doutorado.

Ao meu amigo Eliclécio Rodrigues, por dividir esse período de doutorado comigo como um bom companheiro, compartilhando tanto as angústias, inerentes a esse processo, quanto os melhores momentos.

À minha amiga Adelânia Roque pelo incentivo diário, por me ajudar a retomar meus passos quando os perdia, enfim, pela amizade construída.

À minha amiga Glaucia Guedes por se fazer presente até quando não estava fisicamente ao meu lado, pelo apoio e amizade incondicionais.

Ao meu marido Micarton Correia por me apoiar em todos os aspectos ao longo dessa jornada, por acreditar em mim, por caminhar ao meu lado, por assumir nossa filha em diversos momentos para que eu pudesse escrever e por suportar minhas tensões e ausência. Esta tese não existiria sem a sua ajuda. Sua simples presença me tranquiliza e me inspira.

À minha filha Íris por ter aguentado meu ritmo frenético ao longo da gestação, por me tornar uma mulher mais forte e por me fazer ressignificar tudo ao meu redor, com o amor único que trouxe para minha vida.

Aos meus pais Ângelo Barbosa e Teresa Riello, pelo incentivo e investimento nos meus estudos, por todo amor e pelos bons exemplos. Grande fonte de motivação para mim vem de tentar me enxergar pelo olhar de vocês. Ao meu irmão Guilherme Riello pela torcida, pela preocupação comigo e pelo interesse na minha felicidade. À Joeci Andrade por repetir sempre que sou capaz de “tirar de letra” cada desafio que apareça. À minha avó Bertha Riello pelas orações e carinho. Ao meu *pet* Mel por estar ao meu lado, com seu incentivo silencioso, durante cada dia da elaboração desta tese.

Acima de tudo, quero agradecer a Deus e à Nossa Senhora por me guiarem de forma tão perceptível, desfazendo cada obstáculo que se colocou em meu caminho ao longo dessa caminhada.

Por último, agradeço aos pacientes participantes deste projeto, pelo ato altruísta de aceitar participar desta pesquisa, pelo tempo pacientemente cedido, pelas conversas que foram fonte de aprendizado para mim e pelo tratamento carinhoso durante as consultas.

“É preciso força pra sonhar e perceber  
Que a estrada vai além do que se vê”  
Além do que se vê – Los Hermanos

## RESUMO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de doenças clonais das células progenitoras hematopoiéticas caracterizadas por citopenias e displasias devido à hematopoiese ineficiente. A SMD é considerada uma neoplasia pela tendência à expansão de clones anormais podendo evoluir para leucemia mieloide aguda (LMA). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a SMD se divide em categorias como Anemia refratária (AR), Anemia refratária com sideroblastos em anéis (ARSA), Citopenia refratária com displasia multilinear (CRDM) e Anemia refratária com excesso de blastos (AREB), esta última sendo o tipo mais grave. De acordo com a evolução da doença e as taxas de sobrevivência, o Sistema Internacional de Classificação de Prognóstico (IPSS) classifica em muito baixo (sobrevivência de 8,8 anos), baixo (sobrevivência de 5,3 anos), intermediário (sobrevivência de 3 anos), alto (sobrevivência de 1,6 anos) e muito alto (sobrevivência de 0,8 anos). Até o presente momento, não foi feita nenhuma relação entre alterações na microbiota intestinal em pacientes com SMD, embora evidências recentes tenham apontado para um importante papel da microbiota intestinal na hematopoese. Neste contexto, o presente estudo visou analisar o perfil da microbiota de pacientes com SMD buscando possíveis associações clínicas, bem como avaliar uma possível interferência de sintomas de depressão na composição dessa microbiota. Para tanto, foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA a partir da extração de DNA diretamente das amostras fecais de 30 pacientes com SMD e 16 controles idosos saudáveis. A diversidade e riqueza da microbiota intestinal foi avaliada pelos índices Shannon, Simpson e Chao1 e a contribuição de outras variáveis (subtipos de SMD, cariótipo, hemograma, IPSS, uso de alfaepoetina (EPREX®), dependência transfusional, gordura corporal, estilismo, fumo e depressão) foi obtida por análises multivariadas. Os sintomas psicológicos foram avaliados por meio do inventário de depressão BECK. A partir das análises do sequenciamento, em relação aos filos, foi observado aumento do filo Actinobacteria nos pacientes de subtipo AREB ( $p=0.063$ ), enquanto para o filo Tenericutes, foi observado diminuição da abundância deste filo nos pacientes etilistas ( $p=0.010$ ). No que se refere aos gêneros, foi vista uma redução significativa da abundância do gênero *Ruminococcus* spp. nos pacientes de subtipo AREB ( $p=0.054$ ) e com sintomas depressivos ( $p=0.022$ ); a redução do gênero *Akkermansia* spp. foi encontrada nos pacientes SMD ( $p=0.009$ ), principalmente nos de IPSS alto ( $p=0.035$ ); enquanto que, o gênero *Prevotella* spp. mostrou-se aumentado significativamente nos pacientes com IPSS alto ( $p=0,019$ ) e reduzido nos pacientes submetidos à terapia com EPREX® ( $p=0.008$ ). Adicionalmente, foi estudado em separado o caso de uma paciente de 49 anos portadora de SMD e síndrome de Bloom. No sequenciamento da microbiota desta paciente, notou-se o domínio do filo Verrucomicrobia (gênero *Akkermansia* spp.) que foi associado ao uso de antibióticos de forma rotineira, à presença de adenoma colorretal e ao quadro de desnutrição característico da síndrome de Bloom. Em conclusão, os achados do presente estudo mostram uma importante correlação entre alterações na microbiota intestinal e subtipos clínicos de SMD de alto risco, com destaque para uma correlação inversa entre SMD de alto risco e os gêneros *Akkermansia* spp. e *Ruminococcus* spp. Ademais, encontramos uma forte associação entre a presença de sintomas de depressão e a redução significativa do gênero *Ruminococcus* spp, bem como uma associação entre o gênero *Prevotella* spp e a terapia com EPREX®.

**Palavras-chave:** microbiota intestinal; síndrome mielodisplásica; gene 16S rRNA; depressão

## ABSTRACT

The Myelodysplastic Syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal diseases of hematopoietic progenitor cells characterized by cytopenias and dysplasias due to ineffective hematopoiesis and being considered a neoplasm due to the tendency to expand abnormal clones and may develop into acute myelogenous leukemia (AML). According to the World Health Organization, MDS is divided into categories such as refractory anemia (RA), refractory anemia with sideroblasts (RASA), refractory cytopenia with multilineal dysplasia (RCMD), and refractory anemia with excess blasts (RAEB), the latter being the most serious type of MDS. Covering the evolution of the disease and survival rates, the International Prognostic Classification System (IPSS) ranks very low (survival 8.8 years), low (survival 5.3 years), intermediate (survival 3 years), high (survival 1.6 years) and very high (survival 0.8 years). To date, no relationship has been made between changes in the intestinal microbiota in patients with MDS, although recent evidence has pointed to an important role of the gut microbiota in hematopoiesis. The present study aimed to analyze the microbiota profile of patients with SMD searching for possible clinical associations, as well to evaluate a possible interference of depression symptoms in the composition of this microbiota. In order to do so, the 16S rRNA gene was sequenced from the extraction of DNA directly from fecal samples from 30 MDS patients and 16 healthy elderly controls. The diversity and richness of the intestinal microbiota was evaluated by the Shannon, Simpson and Chao1 indices, and the contribution of other variables (subtypes of MDS, karyotype, blood count, IPSS, use of EPREX, transfusional dependence, body fat, styling, smoking and depression) was obtained by multivariate analysis. Psychological symptoms were assessed through the BECK depression scale. From the analysis of the sequencing, in relation to the phyla, it was observed a reduction of the phylum Actinobacteria in patients of subtype AREB ( $p = 0.063$ ); for the filo Tenericutes, it was observed a decrease in the abundance of this phylum in the alcoholic patients ( $p = 0.010$ ). As regards genera, a significant reduction in the abundance of the genus *Ruminococcus* spp. AREB subtype patients ( $p = 0.054$ ) and with depressive symptoms ( $p = 0.022$ ); the reduction of the genus *Akkermansia* spp. was found in SMD patients ( $p = 0.009$ ), mainly in the high IPSS ( $p = 0.035$ ); while the genus *Prevotella* spp. ( $p = 0.019$ ) was increased in this group and reduced in patients undergoing EPREX therapy ( $p = 0.008$ ). In addition, the case of a 49-year-old patient with MDS and Bloom's syndrome was studied separately in the microbiota sequencing. It was observed the predominance of the phylum Verrucomicrobia (genus *Akkermansia* spp.) That was associated with the use of antibiotics the presence of colorectal adenoma and the malnutrition, characteristic of Bloom's syndrome. In conclusion, the findings of the present study show an important correlation between changes in the gut microbiota and clinical subtypes of high-risk MDS, with an inverse correlation between high-risk MDS and the genera *Akkermansia* spp. and *Ruminococcus* spp.. In addition to finding a strong association between the presence of depression syndromes and the significant reduction of the genus *Ruminococcus* spp ..

**Keywords:** gut microbiota; Myelodysplastic Syndrome; 16S rRNA gene, depression

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do gene 16S rRNA.....	26
Figura 2 - Microscopia eletrônica da bactéria <i>Akkermansia muciniphila</i> . ....	28
Figura 3 - Dietas e suas consequências na microbiota intestinal.....	30
Figura 4 - Consequência da administração oral de ferro na composição e no metabolismo da microbiota intestinal. ....	33
Figura 5 – O lúmen intestinal e seus componentes. ....	37
Figura 6 – Diversos caminhos do eixo cérebro-intestino. ....	38
Figura 7 - Conexão bidirecional entre a microbiota intestinal humano e o envelhecimento do hospedeiro.....	42
Figura 8 - Composição da microbiota de acordo com os estágios da vida humana. ....	43
Figura 9 - Modelo hierárquico da hematopoiese. ....	44
Figura 10 - Hematopoiese vs. microbiota. ....	46
Figura 11 - Esquema da patogênese da SMD.....	48
Figura 12 - Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R. ....	51
Figura 13 - Paciente SMD25 portadora da síndrome de Bloom.....	99



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação clínica da SMD segundo OMS 2008.....	49
Tabela 2 - Classificação clínica da SMD segundo OMS 2016.....	50
Tabela 3 - Compilado dos principais resultados.....	98
Tabela 4- Interseção entre os pacientes com SMD de alto risco e ocorrência das variáveis analisadas nesse grupo de pacientes. ....	98

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição do número de sequências (após cortes de qualidade) por amostra fecal sequenciada.....	66
Gráfico 2 - Distribuição da abundância relativa dos filos das amostras fecais. ....	67
Gráfico 3 - Distribuição de classes nas amostras fecais. ....	68
Gráfico 4 - Distribuição de ordens nas amostras fecais.....	69
Gráfico 5 - Distribuição de famílias nas amostras fecais. ....	70
Gráfico 6 - Distribuição de gêneros nas amostras fecais.....	71
Gráfico 7 - Diversidade e riqueza das amostras. ....	72
Gráfico 8 – Correlação significativas entre os gêneros encontrados.....	73
Gráfico 9 – Distribuição de filos de acordo com os subtipos de SMD. ....	75
Gráfico 10 – Distribuição do filo Actinobacteria de acordo com os subtipos de SMD. ....	75
Gráfico 11 – Distribuição de gêneros de acordo com os subtipos de SMD.....	76
Gráfico 12 – Distribuição do gênero <i>Ruminococcus</i> spp. de acordo com os subtipos de SMD. .....	77
Gráfico 13 – Distribuição do gênero <i>Streptococcus</i> spp. de acordo com os subtipos de SMD. .....	77
Gráfico 14 - Distribuição de filos de acordo com os resultados de cariótipo dos pacientes com SMD.....	78
Gráfico 15 - Distribuição de gênero de acordo com os resultados de cariótipo dos pacientes com SMD.....	79
Gráfico 16 - Distribuição do filo Verrucomicrobia de acordo com os níveis de hemoglobina. .....	80
Gráfico 17 - Distribuição do gênero <i>Akkermansia</i> spp. de acordo com os níveis de hemoglobina. .....	80
Gráfico 18 - Distribuição do filo Firmicutes de acordo com os níveis de neutrófilos. ....	81
Gráfico 19 - Distribuição do gênero <i>Ruminococcus</i> _UCG-002 de acordo com os níveis de plaquetas. ....	82
Gráfico 20 - Distribuição de filos de acordo com escore prognóstico IPSS. ....	83
Gráfico 21 - Distribuição de gêneros de acordo com escore prognóstico IPSS. ....	84

Gráfico 22 - - Distribuição do gênero <i>Akkermansia</i> spp. de acordo com escore prognóstico IPSS e pacientes controle.....	85
Gráfico 23 - - Distribuição do gênero <i>Akkermansia</i> spp. de acordo com escore prognóstico IPSS. ....	86
Gráfico 24 - Distribuição do gênero <i>Prevotella</i> spp. de acordo com escore prognóstico IPSS. ....	87
Gráfico 25 - Distribuição do gênero <i>Prevotella</i> spp.de acordo com o uso de EPREX. ....	88
Gráfico 26 - Distribuição dos filios de acordo com a dependência transfusional dos pacientes. ....	89
Gráfico 27 - Distribuição dos gêneros de acordo com a dependência transfusional dos pacientes. ....	90
Gráfico 28 - Distribuição dos filios de acordo com a gordura corporal dos pacientes.....	91
Gráfico 29 - Distribuição dos gêneros de acordo com a gordura corporal dos pacientes. ....	92
Gráfico 30 - Distribuição de filios em relação aos pacientes fumantes e etilistas.....	93
Gráfico 31 - Distribuição do filo <i>Tenericutes</i> de acordo com o consumo de álcool. ....	94
Gráfico 32 - Distribuição dos filios em relação aos grupos de pacientes não deprimidos e deprimidos. ....	95
Gráfico 33 - Distribuição dos gêneros em relação aos grupos de pacientes não deprimidos e deprimidos. ....	96
Gráfico 34 - Distribuição do gênero <i>Ruminococcaceae</i> UCG-014 em relação aos grupos de pacientes não deprimidos e deprimidos.....	97
Gráfico 35 - Sequenciamento da amostra fecal da paciente SMD25. ....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AGCCs</b>	ácidos graxos de cadeia curta
<b>AINEs</b>	anti-inflamatórios não esteroidais
<b>AR</b>	anemia refratária
<b>AREB</b>	anemia refratária com excesso de blastos
<b>ARSA</b>	anemia refratária com sideroblastos em anel
<b>BDNF</b>	fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>CHTs</b>	células-tronco hematopoiéticas envelhecidas
<b>CLP</b>	progenitoras linfóides comuns
<b>CMP</b>	progenitoras mielóides comuns
<b>CRDM</b>	citopenia refratária com displasia multilinhagem
<b>DAP</b>	ácido diaminopimélico
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>FAB</b>	franco-americano-britânica
<b>FCR</b>	<i>fear of cancer recurrence</i>
<b>GABA</b>	ácido gama-aminobutírico
<b>HHA</b>	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
<b>IMC</b>	índice de massa corporal
<b>IPSS</b>	índice Internacional de Escore Prognóstico
<b>LMA</b>	leucemia mielóide aguda
<b>LT-HSC</b>	<i>long term hematopoietic stem cell</i>
<b>MO</b>	medula óssea
<b>NR</b>	neutropenia refratária
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAMPs</b>	padrões moleculares associados a patógenos
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PRRs</b>	receptores celulares de reconhecimento de padrões
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>SMD</b>	síndrome mielodisplásica
<b>SMD- SA-DU</b>	SMD com sideroblastos em anel de única linhagem
<b>SMD-DM</b>	SMD com displasia de múltiplas linhagens
<b>SMD-DU</b>	SMD com displasia de uma única linhagem
<b>SMD-EB 1</b>	SMD com excesso de blastos-1
<b>SMD-EB 2</b>	SMD com excesso de blastos-2
<b>SMD-SA-DM</b>	SMD com sideroblastos em anel de múltiplas linhagens
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>ST-HSC</b>	<i>short term hematopoietic stem cell</i>
<b>TLRs</b>	receptores do tipo Toll

**TR** trombocitopenia refratária  
**TRAF3** fator-3 associado ao receptor de TNF

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	A microbiota e seu universo paralelo.....	23
2.2	Composição da microbiota intestinal humana.....	24
2.3	Holofotes na <i>Akkermansia muciniphila</i> .....	28
2.4	Composição da microbiota vs. fatores extrínsecos.....	29
2.4.1	<i>Nutrição</i> .....	29
2.4.2	<i>Uso de medicamentos</i> .....	31
2.4.3	<i>Estilo de vida</i> .....	34
2.5	Composição da microbiota vs. fatores intrínsecos.....	35
2.5.1	<i>Barreira intestinal e sistema imunológico do hospedeiro</i> .....	35
2.5.2	<i>O eixo cérebro-intestino e a depressão</i> .....	37
2.6	Acompanhando a senescência do hospedeiro.....	41
2.7	Hematopoiese.....	43
2.8	Síndrome Mielodisplásica.....	47
3	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	54
4	OBJETIVOS.....	55
4.1	Objetivo geral.....	55
4.2	Objetivos específicos.....	55
5	METODOLOGIA.....	56
5.1	Pacientes.....	56
5.2	Crterios de incluso e exclusão.....	57
5.3	Aspectos éticos.....	57
5.4	Variáveis analisadas.....	58
5.4.1	<i>Dados do paciente, classificação da SMD e prognóstico</i> .....	58
5.4.2	<i>Celularidade da medula óssea e cariótipo</i> .....	58
5.4.3	<i>Hemograma</i> .....	59
5.4.4	<i>Dados nutricionais</i> .....	59
5.4.5	<i>Variáveis analisadas após sequenciamento</i> .....	59
5.5	Avaliação Nutricional.....	60
5.5.1	<i>Antropometria</i> .....	60
5.5.2	<i>Consumo Alimentar</i> .....	61

5.6	Amostras de sangue e medula óssea.....	61
5.7	Coleta e tratamento das amostras fecais .....	61
5.8	Testes laboratoriais.....	62
5.8.1	<i>Extração de DNA</i> .....	62
5.9	Sequenciamento e análise dos dados .....	62
5.9.1	<i>Análises da <math>\alpha</math>-diversidade e riqueza</i> .....	64
5.9.2	<i>Estatística</i> .....	65
6	<b>RESULTADOS</b> .....	66
6.1	Dados gerais do sequenciamento .....	66
6.2	Análises de diversidade e riqueza da microbiota intestinal.....	72
6.3	Análise dos resultados de acordo com as variáveis clínicas da SMD.....	74
6.3.1	<i>Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com os subtipos de SMD</i> 74	
6.3.2	<i>Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o Cariótipo</i> .....	78
6.3.1	<i>Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o Hemograma</i> .....	79
6.3.2	<i>Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o IPSS</i> .....	82
6.3.3	<i>Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o uso de EPREX</i> .....	88
6.3.4	<i>Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com a Dependência transfusional</i> .....	89
6.4	Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com as variáveis nutricionais .....	91
6.4.1	<i>Gordura corporal</i> .....	91
6.4.1	<i>Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com a manifestação ou não de depressão</i> .....	95
6.5	Compilado dos resultados e suas associações.....	98
6.6	Relato de caso: Síndrome de Bloom.....	99
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	101
7.1	Relato de caso: Síndrome de Bloom.....	110
7.2	Limitações e Perspectivas.....	112
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	113
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	114
	<b>ANEXO I - INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO BECK</b> .....	123
	<b>ANEXO II - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b> .....	126
	129	
	<b>APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	130

**APÊNDICE II - EXCERTO DA TABELA DE METADADOS: CARACTERIZAÇÃO  
DOS PACIENTES. .... 133**



## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que existam entre 500 e 1.000 espécies de bactérias no corpo humano. Apesar de alguns indivíduos compartilharem mais de 99,9% do genoma humano, existem diferenças significativas no microbioma (70-90%). Pode-se enxergar assim que essas diferenças nas composições de microbiota são relevantes nas diversas respostas fisiológicas humanas e na susceptibilidade às doenças.

Com o advento de técnicas moleculares e de seu aperfeiçoamento, como o surgimento da identificação da microbiota bacteriana com base no sequenciamento do gene 16S do RNA ribossômico, foi possível comprovar que alterações no microbioma intestinal e suas interações com os sistemas imunológico, endócrino e nervoso, estão correlacionados com uma ampla gama de doenças. Há a atual correlação sendo formada entre a composição da microbiota do indivíduo/infecção e sua interferência nos processos hematológicos.

Os indivíduos idosos estão mais sujeitos ao surgimento de alterações hematológicas, tanto por influência da disbiose intestinal, oriunda da exposição concomitante a múltiplas drogas/antibióticos, que ocorre pela introdução de terapias com o passar da idade e mudanças nos hábitos alimentares, como pela própria senilidade do organismo. Ademais, células-tronco hematopoiéticas envelhecidas (CTHs) geram mais células mielóides e menos células linfóides em comparação com CTHs jovens, contribuindo para a diminuição da imunidade adaptativa em indivíduos idosos.

Correspondendo a uma condição hematopoiética maligna associada ao avanço da idade, a Síndrome Mielodisplásica (SMD) é classificada como um grupo heterogêneo de doenças clonais das células progenitoras hematopoiéticas (CPH), caracterizadas por alterações de diferenciação e maturação celular que acarretam displasias em uma ou mais linhagens celulares, citopenia(s) no sangue periférico, medula óssea (MO) hiper celular e risco de evolução para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) em 30% a 40% dos casos.

Embora os eventos relacionados à patogênese da SMD sejam provenientes de defeitos moleculares nas células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, vale ressaltar que a hematopoiese ineficaz encontrada na doença pode ser intensificada por anormalidades interferentes provindas de outros microambientes, uma vez que a causa da SMD primária é idiopática. Além disso, as diferentes respostas aos tratamentos, incluindo à quimioterapia e ao

transplante de medula óssea, e o prognóstico variável podem estar associados às demais características que não as avaliadas rotineiramente no decorrer do manejo clínico.

Diante desse contexto e de suas lacunas, o presente trabalho objetivou avaliar o perfil da microbiota intestinal dos pacientes com SMD, buscando uma correlação dos achados com os principais parâmetros clínicos da doença e com o prognóstico desses pacientes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A microbiota e seu universo paralelo

O termo “microbiota” é definido como o conjunto de microrganismos presentes em um ambiente (MARCHESI; RAVEL, 2015). Até alguns anos atrás, acreditava-se que a microbiota humana funcionava como um “micro” ecossistema composto por bactérias, vírus, fungos e protozoários, que parasitavam o organismo humano. No entanto, com o avançar dos estudos, foi esclarecido que há uma relação mutualística entre o organismo humano e a microbiota, pois é uma associação entre populações diferentes em que ambas se beneficiam, podendo estabelecer ou não um estado de interdependência fisiológica. Na homeostase, a microbiota se beneficia do ambiente quente e rico em nutrientes do intestino, com o qual estabelece um ecossistema primariamente estável. Os humanos, por sua vez, se beneficiam de um mecanismo metabólico que, além de fornecer fatores essenciais, como vitaminas, também aumenta substancialmente nossa capacidade de extrair nutrientes dos alimentos. Esse aumento da capacidade digestiva é principalmente resultado da complementação da microbiota da limitada diversidade de enzimas, codificadas pelo genoma humano, que metabolizam carboidratos complexos (MAYNARD *et al.*, 2012).

Estima-se que existam entre 500 e 1.000 espécies de bactérias no corpo humano (TURNBAUGH *et al.*, 2007). Fazendo um comparativo com o número de células constituintes do organismo humano, foi feita uma estimativa refinada baseada na observação experimental e extrapolação, chegando à proporção de 1,3 células bacterianas para cada 1 célula humana. Embora essas estimativas reduzam a proporção em que as células microbianas superam as células humanas, elas ilustram a diversidade de vida microbiana associada ao corpo humano (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

No entanto, sabe-se que, além da composição da microbiota, a sua funcionalidade gera impactos ainda maiores na saúde do hospedeiro (MILLS *et al.*, 2019). A fim de abranger tal complexidade, surgiu o termo Microbioma. Este termo refere-se a todo o habitat, incluindo os microrganismos, seus genomas (conjunto de genes) e as condições ambientais circundantes. Essa definição é baseada na definição de “bioma”, composta pelos fatores bióticos e abióticos de determinados ambientes (MARCHESI; RAVEL, 2015). Neste contexto, uma estimativa empírica calcula que de 1.000 espécies bacterianas no intestino com 2.000 genes por espécie

possui acerca de 2.000.000 de genes, o que é 100 vezes o valor comumente estimado de aproximadamente 20.000 genes humanos (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

Apesar de alguns indivíduos compartilharem mais de 99,9% do genoma humano, existem diferenças no microbioma (70-90%). Isto sugere que o efeito do genoma humano é limitado em relação à composição da microbiota e que a maior parte do desenvolvimento da comunidade microbiana se dá por meio de fenótipos, ou seja, é determinada principalmente por influência de fatores ambientais. Tal suposição foi comprovada em estudos, nos quais gêmeos monozigóticos não eram mais semelhantes em termos de microbiota intestinal em geral se comparados com gêmeos dizigóticos (RIDAURA *et al.*, 2013). Deste modo, pode-se enxergar essas diferentes composições de microbiota como sendo relevantes nas diversas respostas fisiológicas humanas e na susceptibilidade às doenças (PARFREY *et al.*, 2012).

## 2.2 Composição da microbiota intestinal humana

Em relação ao estudo da microbiota intestinal, o uso de técnicas baseadas em cultura *in vitro* acaba por ser tendencioso em favor de organismos aeróbicos que são facilmente cultiváveis, e em detrimento das bactérias anaeróbicas que têm o seu cultivo dificultado. Além disso, essas técnicas subestimam a diversidade de bactérias no conteúdo luminal intestinal e, por não possuírem a sensibilidade necessária, sua utilidade no estudo de mudanças no perfil da microbiota intestinal é limitada, uma vez que 60-70% das bactérias intestinais não podem ser cultivadas por métodos convencionais (SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019). Para superar essas limitações das técnicas de cultura e com o advento de técnicas avançadas para a identificação taxonômica, no final do século XX, foram desenvolvidas várias abordagens moleculares para o estudo de material genômico bacteriano, com destaque para a identificação bacteriana com base nas sequências de seus genes da porção 16S do RNA ribossômico (16S rDNA) (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

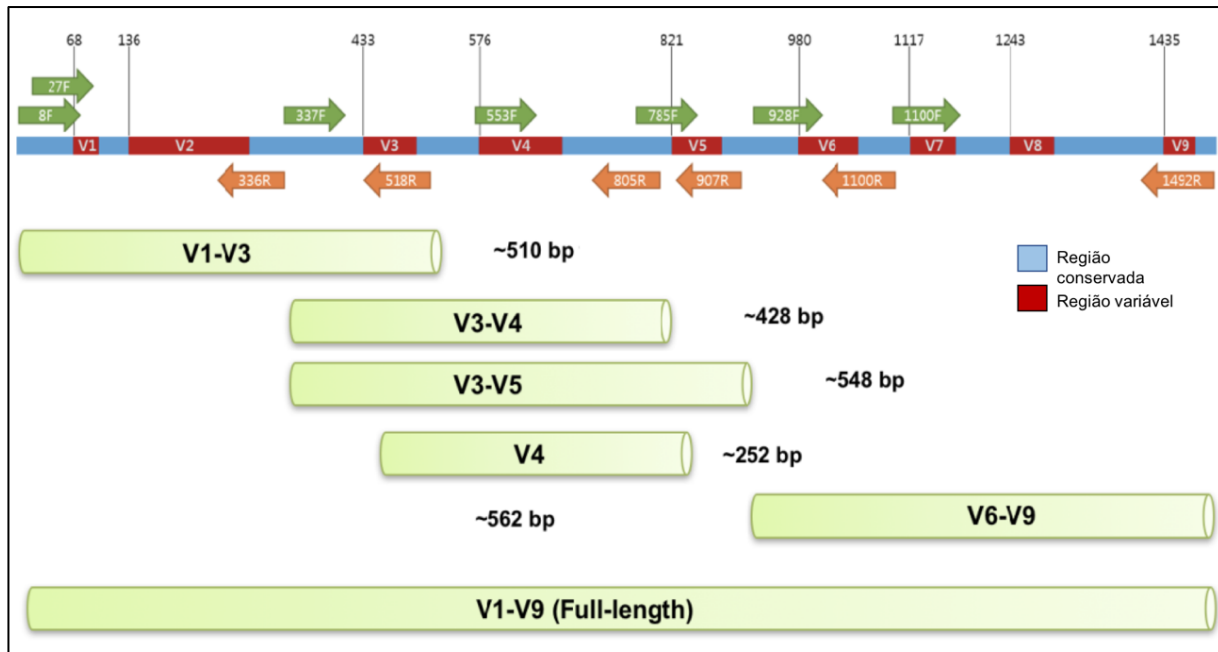
O 16S rRNA representa o ácido ribonucléico da porção 16S do ribossomo, onde S (Svedberg) é uma unidade de medida (taxa de sedimentação). Este rRNA é um constituinte importante componente da pequena subunidade 30S dos ribossomos procarióticos, bem como mitocôndrias e cloroplastos. O segmento de DNA que codifica o rRNA é chamado de gene rRNA ou rDNA. Para efeitos de sequenciamento, a informação da sequência é obtida a partir do gene 16S, e não diretamente do rRNA, uma vez que o DNA é muito mais fácil de ser

processado e é contemplado por uma gama maior e melhor otimizada de plataformas de sequenciamento (HUGENHOLTZ *et al.*, 2017).

O gene 16SrRNA apresenta características que o enquadram como um *barcode* do DNA bacteriano, dentre elas pode-se citar: i) sua onipresença nos membros de Bacteria e Archaea; ii) o fato de apresentar informações suficientes, não sendo demasiadamente curto ou longo (1500pb); iii) possui variação genética adequada para ser usada na análise filogenética para as amplas faixas taxonômicas; e iv) é facilmente amplificado por PCR (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

Sabe-se que a sequência entre o 16S bacteriano não é uniformemente distribuída, pois apresenta regiões de consenso, relativas ao domínio Bacteria (presentes em todas as bactérias), e regiões de variabilidade que são específicas de gêneros e espécies particulares. Nove regiões hipervariáveis foram identificadas no gene rRNA 16S, denominadas de V1 a V9 (Figura 1), e são ideais para análises mais apuradas de diversidade intra e interespecífica entre indivíduos com elevado grau de semelhança genética (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

Figura 1 - Representação esquemática do gene 16S rRNA.



Representação esquemática do gene 16S rRNA, com suas regiões conservadas (azul) e hipervariáveis (vermelho) e a estimativa de seu comprimento em pares de base. Primers *forward* e *reverse* (setas verdes e laranjas respectivamente) para as 9 regiões hipervariáveis. Fonte: adaptado de Pacific Bioscience.

A análise filogenética dos genes rRNA 16S bacteriano, amplificados diretamente de amostras complexas, fornece uma estratégia eficiente para explorar a biodiversidade de uma biota em particular (SUAU *et al.*, 1999). Análises iniciais de sequenciamento 16S rDNA permitiram a tipagem filogenética de bactérias que não haviam sido cultivadas. A exemplo, Eckburg e colaboradores, 2005, foram surpreendidos ao contestar que 62% das 395 bactérias encontradas em seu estudo foram novas e cerca de 80% das sequências de RNA foram de espécies não cultivadas previamente. Vale ressaltar também que o sequenciamento 16S rRNA constituiu a metodologia base para a caracterização Projeto Microbioma Humano (HMP) (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

Após as abordagens moleculares e estudos acerca desse tema, sabe-se que a composição e a densidade microbiana aumentam da extremidade proximal para a extremidade distal do intestino humano e corresponde a uma biomassa de 1,5 a 2,0 kg, dominada por bactérias estritamente anaeróbias. Archaea, Eukarya e vírus também estão presentes, mas sua relevância para a saúde humana tem sido menos estudada (BALZOLA *et al.*, 2010).

O perfil da microbiota intestinal é dinâmico ao longo da vida e se desenvolve em paralelo ao desenvolvimento e hábitos de seu hospedeiro. Apesar de existir um padrão esperado,

a composição da microbiota intestinal é influenciada por fatores ambientais que começam no início da vida (STEWART *et al.*, 2018). O processo de maturação da microbiota, que ocorre nos três primeiros anos de vida, é um dos parâmetros de desenvolvimento relevante para que a criança tenha uma vida saudável e possa se desenvolver plenamente (YATSUNENKO *et al.*, 2012). Um marco para a mudança da constituição da microbiota é a introdução alimentar, ou seja, o início da ingestão de alimentos sólidos. De acordo com os achados de Stewart e colaboradores, 2018, existem 3 fases de progressão do microbioma: fase de desenvolvimento (3-14 meses), fase de transição (15-30 meses) e fase estável (31-46 meses).

A microbiota intestinal humana de adultos é composta predominantemente por cinco filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, em ordem de abundância. Os principais membros do filo Firmicutes são os gêneros *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp. e *Ruminococcus* sp., bem como as bactérias produtoras de butirato (ácidos graxos de cadeia curta - AGCC) *Eubacterium* sp., *Fecalibacterium* sp. e *Roseburia* sp. (HUGENHOLTZ *et al.*, 2017).

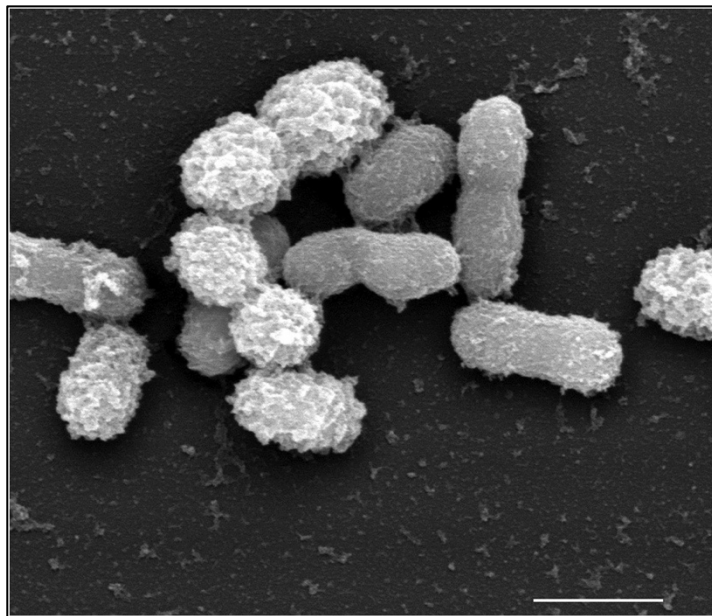
Por sua vez, os membros de Bacteroidetes são conhecidos por serem eficientes degradadores de fibra alimentar e incluem os gêneros *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp. e *Xylanibacter* sp.. *Bifidobacterium* sp. é o gênero principal dentro do filo Actinobacteria, bastante usado como probióticos. Dentre as Proteobactérias destaca-se *Escherichia* sp. e *Desulfovibrio* sp., enquanto que a Verrucomicrobia pode-se citar o gênero *Akkermansia* sp. (BALZOLA *et al.*, 2010), por se mostrar atuante na manutenção da homeostase intestinal e em demais processos metabólicos, esta bactéria será melhor enfatizada abaixo.

De acordo com os padrões de composição encontrados na microbiota intestinal do indivíduo, foi criado o conceito dos enterotipos. Este conceito se refere à categorização da microbiota de seres humanos saudáveis em três grupos, que são definidos pela predominância dos gêneros *Bacteroides* sp. ou *Prevotella* sp. ou *Ruminococcus* sp. Os enterotipos parecem complexos, podem ser influenciados por hábitos nutricionais e não podem ser simplesmente ser explicados pelas condições fisiológicas do hospedeiro, como idade ou índice de massa corporal (IMC), embora existam marcadores funcionais, como genes, que se correlacionam com características dos indivíduos (ARUMUGAM *et al.*, 2011). É evidente que os membros da microbiota intestinal dependem das atividades metabólicas de modo colaborativo e, por outro lado, a competição por condições ambientais e nutrientes nivela a colonização e leva à ocorrência de predominância entre as espécies bacterianas (YATSUNENKO *et al.*, 2012).

### 2.3 Holofotes na *Akkermansia muciniphila*

*Akkermansia muciniphila* (Figura 2) é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia estrita e que não apresenta motilidade. Essa é uma espécie relativamente nova, pertencente ao filo Verrucomicrobia, que demonstra ser atuante na manutenção dos mecanismos de homeostase intestinal. Foi originalmente isolada da amostra fecal de uma mulher caucasiana saudável em um meio específico, que continha mucina purificada como a única fonte de carbono (DERRIEN *et al.*, 2004). Com o seu isolamento veio a descoberta que o filo Verrucomicrobia está representado no intestino por uma porcentagem de 3-5% (DERRIEN; BELZER; DE VOS, 2017).

Figura 2 - Microscopia eletrônica da bactéria *Akkermansia muciniphila*.



Fonte: Darrien; Belzer; de Vos, 2017.

Além do controle da produção de mucina pelas células caliciformes, sua primeira característica observada, foi demonstrado que a presença de *A. muciniphila* induz a secreção de peptídeos antibacterianos como o RegIII $\gamma$  (análogo ao RegIII $\alpha$  em humanos) pelas células de Paneth em ratos, controlando a proliferação de bactérias Gram-positivas, o que reduz a transgressão bacteriana da barreira intestinal (PREIDIS *et al.*, 2015). Ademais, demonstrou-se que a presença de outros peptídeos antibacterianos, defensinas HD5 e HD6, favorecem o



aumento da colonização de *A. muciniphila* em detrimento das bactérias Gram-positivas (EHMANN *et al.*, 2019). Isto configura um feedback positivo entre esses peptídeos e esta bactéria.

Adicionalmente, o aumento da abundância intestinal de *A. muciniphila* tem sido relacionado também ao aumento dos níveis de endocanabinóides na microbiota (BLAND; EDITOR, 2016). Assim, esta bactéria pode também estar atuando de modo indireto na manutenção da integridade da barreira intestinal. Uma vez que foi demonstrado que um lipídio desse sistema, o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), reduz a translocação de LPS, bem como a inflamação sistêmica. Outro acilglicerol, o 2- palmitoilglicerol (2-PG), potencializa os efeitos anti-inflamatórios do 2-AG. É importante ressaltar que o 2-oleoilglicerol (2-OG) estimula a liberação de peptídeos do intestino, como o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o peptídeo-2 semelhante ao glucagon (GLP-2), a partir de células L intestinais. Esses peptídeos estão implicados no controle da homeostase da glicose e da função de barreira intestinal, respectivamente (EVERARD *et al.*, 2013). Os gliceróis constituintes do sistema endocanabinóide estão sendo inclusive utilizados como marcadores da homeostase intestinal (KELLY *et al.*, 2019).

## 2.4 Composição da microbiota vs. fatores extrínsecos

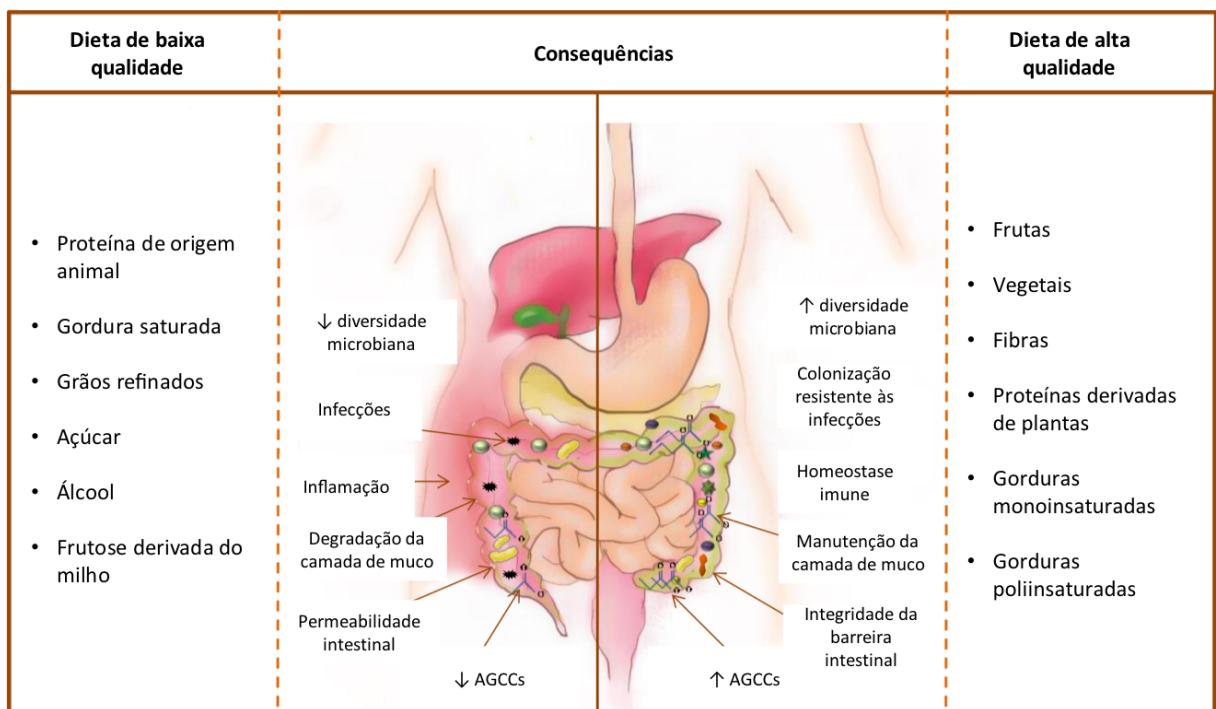
### 2.4.1 Nutrição

A dieta tem sido constante alvo de estudos, sendo vinculada à microbiota intestinal (ALBENBERG; WU, 2014) e menos relacionada às microbiotas presentes nos demais sítios do corpo humano.

Sua influência na composição da microbiota intestinal foi confirmada em vários estudos (MILLS *et al.*, 2019). Mesmo mudanças dietéticas de curto prazo (poucos dias) mostraram alterar a composição da microbiota intestinal humana, como mostra estudo de David e colaboradores (2014), que relataram que a dieta inteiramente baseada em animais (carnes, ovos e queijos) teve um impacto maior na composição da microbiota intestinal do que a dieta à base de plantas (grãos, legumes, frutas e vegetais), resultando na diminuição das bactérias metabolizadoras de plantas e polissacarídeos, como as pertencentes ao filo Firmicutes (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*) e houve aumento na abundância de microrganismos tolerantes à bile, presumivelmente devido ao aumento da secreção de ácidos

biliares como resultado da alta ingestão de gordura. Adicionalmente, a dieta baseada em animais resultou em níveis mais baixos de produtos finais de fermentação de carboidratos, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), que inclui o butirato, propionato e acetato (MILLS et al., 2019) (Figura 3).

Figura 3 - Dietas e suas consequências na microbiota intestinal.



Comparação das consequências de uma dieta de baixa qualidade versus uma dieta saudável na microbiota intestinal. AGCCs = ácidos graxos de cadeia curta. Fonte: Adaptado de Mills et al., 2019.

O butirato é produzido principalmente pelo filo Firmicutes, propionato por Bacteroidetes e acetato pela maioria dos anaeróbios intestinais (MORRISON; PRESTON, 2016). O butirato é a principal fonte de energia para as células epiteliais e desempenha um papel importante na função cerebral (STILLING et al., 2016). Também é conhecido por suas propriedades anti-câncer e anti-inflamatórias (BULTMAN, 2014) e por seu papel no desenvolvimento da barreira intestinal (MORRISON; PRESTON, 2016). O propionato, juntamente com o butirato, ativam a gliconeogênese intestinal, embora ambos usem circuitos diferentes (MORRISON; PRESTON, 2016). Propionato derivado da microbiota intestinal também se mostrou capaz de reduzir a proliferação de células cancerígenas no fígado (BINDELS et al., 2012). Os AGCCs também estão envolvidos na regulação das respostas imunes (MORRISON; PRESTON, 2016).

Assim, a adesão a uma dieta moduladora é uma oportunidade ideal para intervenção de baixo risco e mais aceitável para alterar o microbioma intestinal, neste contexto, a dieta “comida terapêutica” tem sido empregada para avaliar o perfil metabólico do indivíduo após a sua introdução e, como consequência, as alterações de composição da microbiota também podem ser avaliadas (RICH *et al.*, 2013).

Apesar dos diversos achados na área, a maioria dos estudos de microbioma deixam uma questão em aberto: o que vem primeiro? a alteração da microbiota causada pela característica clínica em questão ou a partir da alteração da microbiota intestinal, o hospedeiro está condicionado a ter a determinada característica clínica? (ex. preferências alimentares em função da alteração da microbiota ou o contrário).

Inserida neste *feedback* de causa e efeito, é conhecida também a correlação inversa da abundância de *Akkermansia muciniphila* com o ganho de peso, evento observado em fezes de crianças em idade escolar (KARLSSON *et al.*, 2012) e de adultos (DAO *et al.*, 2016). Tais pesquisadores comprovaram que *A. muciniphila* estava inversamente relacionado à glicemia de jejum, relação cintura-quadril e diâmetro do adipócito subcutâneo em adultos obesos e de sobrepeso. Sujeitos com maior abundância de *A. muciniphila* exibiram estado metabólico mais saudável, particularmente na glicemia de jejum, triglicerídeos plasmáticos e distribuição de gordura corporal. O aumento da abundância de *A. muciniphila* associou-se à melhoria nos marcadores de sensibilidade à insulina e outros parâmetros clínicos. Em concordância à proporcionalidade entre a abundância de *A. muciniphila* e o ganho de peso, observou-se que em ratos desnutridos havia predominância do filo Verrucomicrobia e menos Bacteroidetes no intestino e que tais alterações eram impulsionadas por um aumento da colonização por *A. muciniphila* (PREIDIS *et al.*, 2015).

#### **2.4.2 Uso de medicamentos**

Seria impossível mencionar a antibioticoterapia sem mencionar a disbiose. A disbiose é definida como alterações no microbioma que contribuem para os processos de doença no organismo (MILLER *et al.*, 2019). Sabe-se que esse quadro vem associado à perda da integridade da barreira intestinal e consequente aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (NAGPAL *et al.*, 2018). A disbiose pode ser separada em duas categorias distintas: primeira categoria é a do ganho de função com a disbiose, uma vez que gera mudanças

no microbioma que levam ao surgimento de funções microbianas capazes de causar doenças. Há assim o surgimento de doenças relacionadas a patógenos específicos, como infecção por *Clostridium difficile*, cólera ou doença pneumocócica; na segunda categoria, ocorre a perda de função pela disbiose, onde há o detrimento de funções microbianas correlacionadas à manutenção da homeostase intestinal (BLASER, 2014).

Esta perda de função associada à doença é mais difícil de ser detectada, uma vez que não há um crescimento evidente de um patógeno específico causador dessa mudança. Neste âmbito, estudos encontram níveis significativamente mais baixos de populações bacterianas dos microbiomas associados aos estados de doença, como infecção por *Clostridium difficile* (MILANI *et al.*, 2016), diabetes tipo II (DAO *et al.*, 2016), câncer colorretal (DINGEMANSE *et al.*, 2015), autismo (KELLY *et al.*, 2019), asma (VON MUTIUS, 2016) e obesidade (DAO *et al.*, 2016).

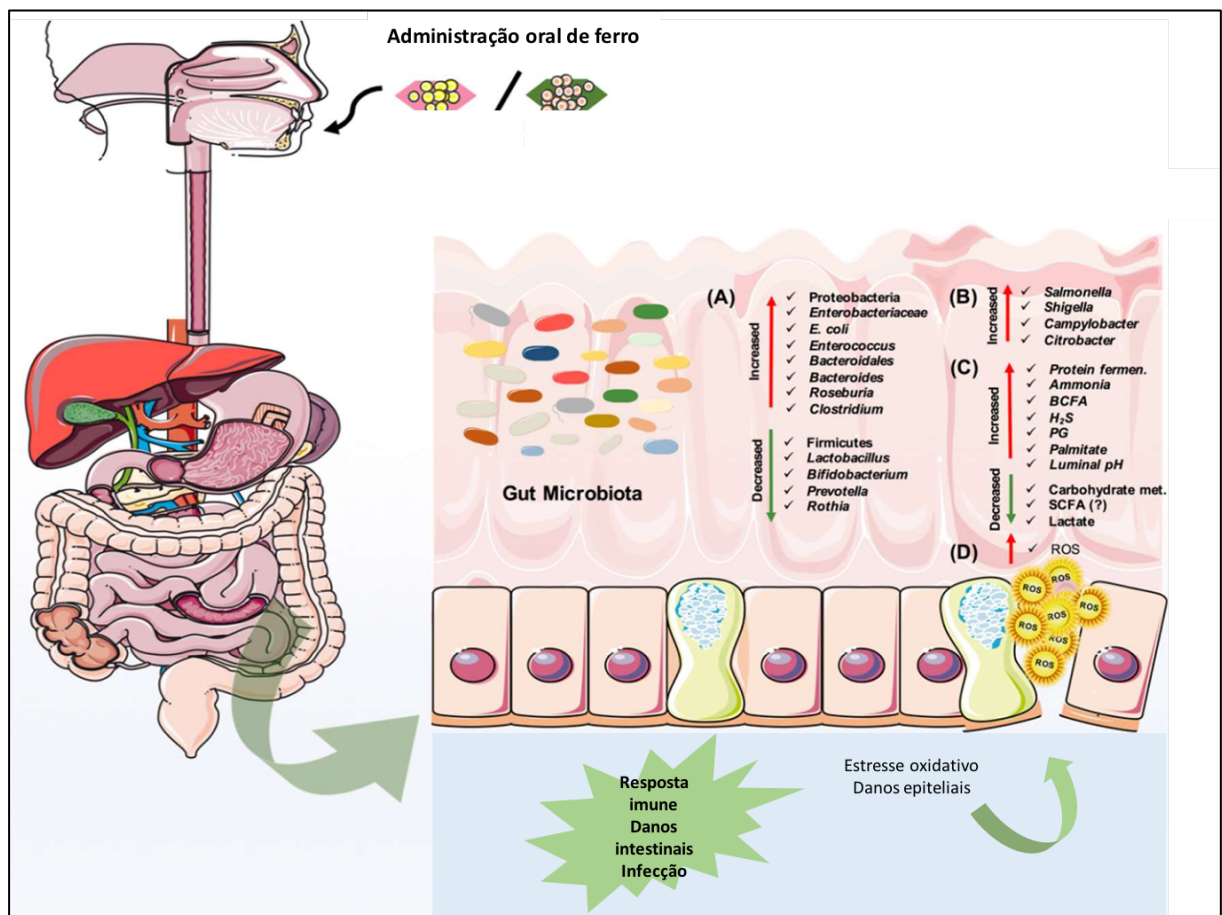
Estima-se que o efeito dos antibióticos seja o tipo de interferência mais devastadoras que possa existir para microbiomas. O microbioma intestinal em adultos não se mostra resiliente à administração repetida de antibióticos (MILLER *et al.*, 2019). O mesmo antibiótico parece afetar ainda os grupos microbianos de maneira diferente (DETHLEFSEN; RELMAN; BECKMAN CENTER, 2010). Isto pode ser devido a diferentes fases de crescimento, ao estado metabólico ou às interrelações existentes entre a comunidade microbiana (GILBERT *et al.*, 2018).

No que se refere ao uso de drogas não antibióticas, uma revisão feita por Le Bastard e colaboradores (2018), revelou que fármacos como metformina, AINEs, opióides e antipsicóticos tem um impacto na diversidade do microbioma intestinal. Os pesquisadores destacaram também que o uso desses fármacos foi associado ao aumento da abundância de membros de Gammaproteobacteria na microbiota intestinal. Além disso, o uso de drogas não antibióticas pode potencializar a colonização por bactérias patogênicas, especialmente *C. difficile*.

Os efeitos de muitos medicamentos comumente usados (anti-hipertensivos, ansiolíticos, broncodilatadores, diuréticos, hormônios tireoidianos) permanecem obscuros e trabalhos futuros são necessários para estudar o impacto dessas drogas na microbiota e associações com desfechos clínicos, especialmente em relação à inflamação ou Suscetibilidade às infecções (LE BASTARD *et al.*, 2018).

O uso de suplementos também gera mudanças na diversidade da microbiota intestinal (MILLS et al., 2019). O ferro administrado por via oral tem um impacto direto na alteração da composição microbiana no intestino. Pode resultar na redução da microbiota benéfica, a exemplo dos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., proporcionando uma oportunidade para a expansão dos patógenos entéricos, tais como enterobactérias. Como mudanças metabólicas da microbiota intestinal, têm-se um aumento na fermentação de proteínas e redução no metabolismo de carboidratos. É importante ressaltar que o ferro pode induzir ainda a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no intestino, o que causa estresse oxidativo e, conseqüentemente, dano epitelial intestinal, ou seja, o comprometimento da integridade da barreira intestinal. Por sua vez, o sistema imune intestinal do hospedeiro responde com inflamação, dano intestinal e possível infecção (Figura 4) (YILMAZ; LI, 2018).

Figura 4 - Conseqüência da administração oral de ferro na composição e no metabolismo da microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de Yilmaz; Li, 2018.

### 2.4.3 *Estilo de vida*

O estilo de vida também demonstra forte influência na composição do microbioma. A exemplo, conviver com animais de estimação, tem uma associação estatisticamente significativa com a composição do microbioma, inclusive sendo correlacionada a um menor risco de surgimento de sintomas de asma (VON MUTIUS, 2016).

Os hábitos cotidianos como a prática de exercícios físicos parece influenciar na estrutura do microbioma através da redução da inflamação, que produz mudanças na composição da comunidade microbiana que estão correlacionadas com as mudanças no perfil de citocinas produzidas pelo organismo (COOK *et al.*, 2016). A fim de elucidar o impacto do exercício na microbiota intestinal, Estaki e colaboradores (2016) analisaram a microbiota de indivíduos saudáveis com diferentes níveis de aptidão física e relataram que a aptidão cardiorrespiratória se correlacionou com o aumento da diversidade microbiana em humanos saudáveis. Outro estudo interessante demonstra que o período de seis semanas de prática de exercício de resistência por mulheres com excesso de peso, ocasionou mudanças no metagenoma intestinal, com ênfase ao aumento de *Akkermansia* spp., promotora de saúde, e uma diminuição do filo Proteobacteria, que tem bactérias patogênicas como membros (MUNUKKA *et al.*, 2018).

A privação do sono também correlaciona-se com alterações no microbioma intestinal, aumentando a proporção do filo Firmicutes em relação ao Bacteroidetes e elevando a abundância de Coriobacteriaceae e Erysipelotrichaceae (BENEDICT *et al.*, 2016). O estresse cotidiano está correlacionado com alterações nos filios Bacteroidetes e Actinobacteria e nas mudanças correspondentes nas concentrações de metabólitos e marcadores inflamatórios, uma vez que esta condição promove o aumento da permeabilidade intestinal (GEVERS *et al.*, 2014).

Outro importante fator que se mostra interligado à composição da microbiota é a atividade ocupacional do indivíduo, pois o ambiente de trabalho pode promover a exposição à compostos químicos insalubres. Agricultores estão submetidos à manipulação de diversos pesticidas e a aplicação destes produtos muitas vezes é feita de modo artesanal, sem levar em conta a proteção do profissional. Foi provado que a exposição crônica ao clorpirifós, inseticida organofosforado comumente usado para o tratamento de hortaliças e no uso domiciliar, induziu a disbiose da microbiota intestinal, associada à proliferação de *Bacteroides* sp. e diminuição dos níveis de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. (JOLY *et al.*, 2013). Estudos demonstram

que a sensibilidade ao glifosato, herbicida mais utilizado em todo o mundo, é peculiar em cepas bacterianas. Testes *in vitro* demonstraram que bactérias patogênicas como *Salmonella* sp., *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* são altamente resistentes ao glifosato, enquanto que bactérias benéficas à microbiota como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus badius*, *Bifidobacterium adolescentis* e *Lactobacillus* sp. são moderadamente a altamente suscetíveis (SHEHATA *et al.*, 2013). Extrapolando esses resultados para o ambiente *in vivo*, pode-se presumir que também ocorreria uma disbiose intestinal ocasionada pela exposição crônica ao glifosato, uma vez que bactérias patogênicas irão se proliferar, em detrimento das bactérias benéficas.

## 2.5 Composição da microbiota vs. fatores intrínsecos

### 2.5.1 Barreira intestinal e sistema imunológico do hospedeiro

Sabendo-se que a microbiota intestinal é constituída por microrganismos patogênicos e benignos, é de suma importância a ação da imunidade inata do organismo, esta representa a primeira barreira seletiva, atuando de forma imediata e não específica contra um determinado agente potencialmente invasor (MAYNARD *et al.*, 2012b).

O epitélio intestinal é a primeira barreira encontrada pelos agentes patogênicos que porventura estejam no lúmen intestinal. As células de Paneth, além de fazerem parte do epitélio intestinal como barreira física, produzem peptídeos antimicrobianos (ORÍÁ *et al.*, 2016), tais como lectinas (ex. RegIII $\alpha$ ) e defensinas (HD5 e HD6) que causam alterações na parede celular das bactérias, promovendo sua lise celular em bactérias Gram-positivas (EHMANN *et al.*, 2019).

As mucinas são secretadas pelas células caliciformes em quantidades significativas (três litros/dia), criam um gel denso protetor que caracteriza uma segunda barreira física e química após o epitélio. O muco também atua como um lubrificante para reduzir o contato do epitélio com metabólitos que possam ter ação tóxica. Adicionalmente, secreções mucóides são ricas em anticorpos IgA e peptídeos antimicrobianos, que efetivamente se ligam às bactérias, prevenindo aderência à mucosa e a proliferação exacerbada (ORÍÁ *et al.*, 2016).

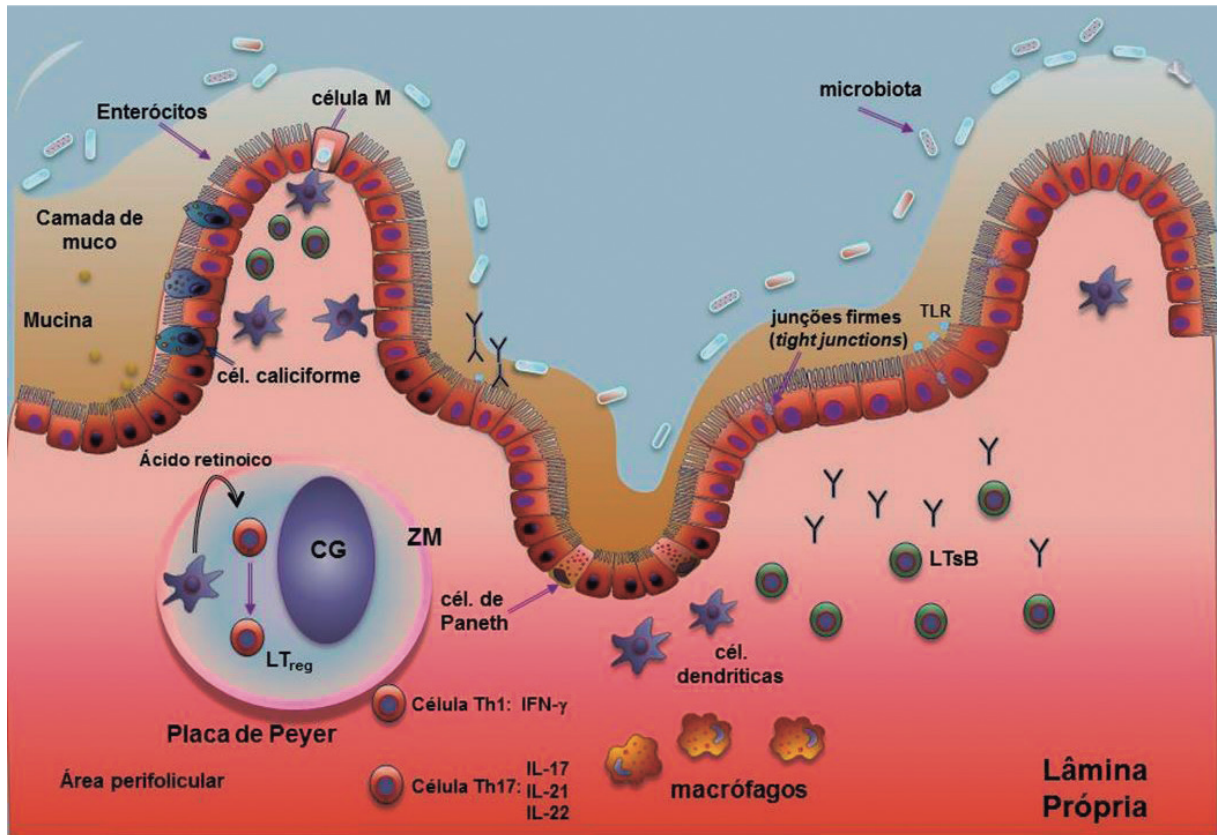
Fisiologicamente, o epitélio intestinal é constituído por uma camada única colunar organizada em vilosidades. A junção célula-célula permite uma permeabilidade seletiva, de modo que permite a passagem de íons e fluidos, assim como mantém a adesão e a comunicação

intercelular. Tal arranjo impede a translocação passiva de componentes hidrofílicos prevenindo, por exemplo, movimento transepitelial de bactérias e seus constituintes como a endotoxina bacteriana LPS (lipopolissacarídeos), peptidoglicanos, dentre outras (ORÍÁ *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que bactérias inviáveis também sofrem translocação.

“Após serem sensibilizadas pelos componentes bacterianos, células apresentadoras de antígeno e células imunes imaturas do tecido linfóide deixam o trato intestinal, e entram em contato com o resto do sistema imunológico através dos linfonodos mesentéricos locais. Os linfócitos, macrófagos, células dendríticas, presentes na barreira intestinal, são capazes de expressar receptores celulares de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs mais estudados são os receptores do tipo Toll (TLRs/Toll-like receptors), os quais medeiam o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O reconhecimento do PAMP promove a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, entre outros fatores de transcrição, resultando na produção de citocinas e quimiocinas que promovem recrutamento de várias células inflamatórias. Além disso, a sinalização de TLRs no intestino influencia a proliferação de células epiteliais, a produção de IgA secretória por células B e expressão de peptídeos antimicrobianos por células epiteliais” (Figura 5) (ORÍÁ *et al.*, 2016).



Figura 5 – O lúmen intestinal e seus componentes.



Epitélio intestinal, contendo enterócitos, células caliciformes, células de Paneth. A barreira de muco e de peptídeos antimicrobianos restringe a penetração de bactérias patogênicas, representada em marrom. Notar linfócitos B (LTsB) e linfócitos T, incluindo células da resposta Th1 e células Th2 e suas citocinas na lâmina própria. Placa de Peyer: CG=centro germinativo do foliculo linfoide; ZM= zona marginal do foliculo linfoide. Fonte: ORÍA *et al.*, 2016.

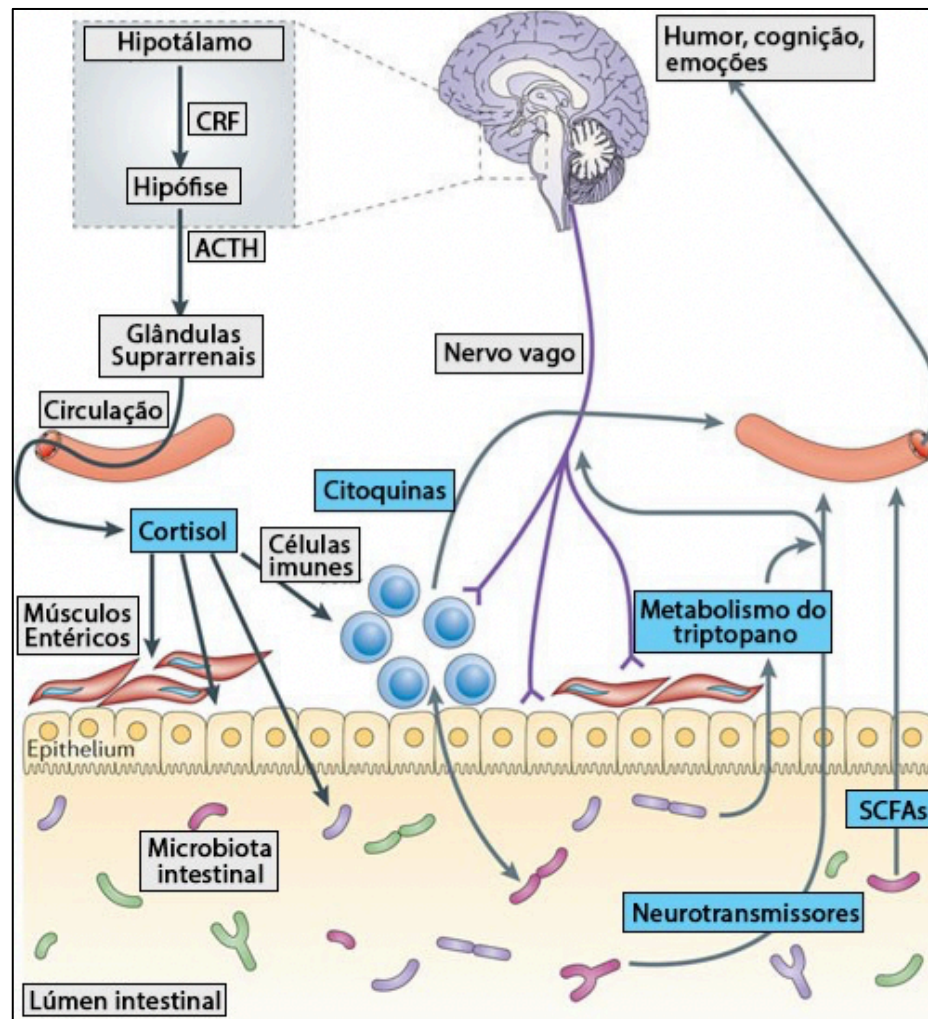
### 2.5.2 O eixo cérebro-intestino e a depressão

O eixo cérebro-intestino é uma via de comunicação bidirecional entre esses dois órgãos, seja ocorrendo de forma direta por meio de receptores do SNC ou, indiretamente, pela produção de vários compostos neuroativos pela microbiota intestinal. Existem inúmeras evidências que confirmam a participação da microbiota em transtornos de ansiedade, depressão e transtornos comportamentais semelhantes (ZALAR; HASLBERGER; PETERLIN, 2018).

Muitas são as vias através das quais a microbiota intestinal pode modular o eixo intestino-cerebral. Pode-se incluir o sistema endócrino (cortisol), imune (citocinas) e neural (vago e sistema nervoso entérico) (Figura 6). Do outro lado, o cérebro recruta esses mesmos

mecanismos para influenciar a composição da microbiota intestinal, por exemplo, sob condições de estresse (CRYAN; DINAN, 2012).

Figura 6 – Diversos caminhos do eixo cérebro-intestino.



Fonte: Landeiro, 2016.

Nessas condições de estresse por exemplo, há a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que faz com que o hipotálamo produza o fator de liberação de corticotrofina (CRF), que por sua vez, estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise. Este último hormônio, promove a liberação de cortisol pelas glândulas suprarrenais (CANEVELLI *et al.*, 2018). Como consequência, o cortisol pode afetar as células imunes, incluindo secreção de citocina, tanto localmente, no intestino, como de modo sistêmico.

Uma vez que a integridade da barreira intestinal é comprometida pela presença do cortisol, há o aumento da permeabilidade intestinal. Além disso, a presença de cortisol na região intestinal pode alterar diretamente a composição da microbiota intestinal (CRYAN; DINAN, 2012).

Com o aumento da permeabilidade, eventos de translocação bacteriana e de seus componentes, tais como LPS, tornam-se facilitados. Por ser reconhecido como um PAMP, há a ativação dos receptores do tipo Toll 4 pelo LPS, incluindo os das micróglias. Assim, o reconhecimento do LPS gera liberação de citocinas inflamatórias no SNC (YARANDI et al., 2016). A partir disso, sabe-se que o LPS pode causar alterações comportamentais durante uma doença aguda ou causar uma alteração tardia do humor após a doença. De modo que as imunoglobulinas IgA e IgM, contra LPS de bactérias intestinais, são encontradas em níveis mais elevados no sangue de pacientes com depressão, sugerindo a influência do LPS na patogênese dessa doença (MAES et al., 2012).

Bactérias têm a capacidade de gerar muitos neurotransmissores e neuromoduladores. Sabe-se que mais de 50% da dopamina é de origem intestinal, especialmente *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus* são citados por contribuírem para sua liberação. Fato comprovado pelas altas concentrações de dopamina na cultura dessas bactérias, sendo 10 a 100 vezes mais altas do que a concentração típica no sangue humano (ALCOCK; MALEY; AKTIPIS, 2014). Também foi descrito que certas estirpes de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. são capazes de secretar ácido gama-aminobutírico (GABA), que é o principal transmissor inibitório no SNC (ZALAR; HASLBERGER; PETERLIN, 2018).

De modo semelhante, mais de 90% da serotonina do corpo é sintetizada no intestino (ZALAR; HASLBERGER; PETERLIN, 2018). Sabe-se ainda que, a desaminação do triptofano (precursor da serotonina), que também é feita pelas bactérias intestinais, é capaz de alterar os índices desse metabólito no hospedeiro e, conseqüentemente, a produção de serotonina no cérebro (ROAGER; LICHT, 2018).

Além da alteração na produção dos neurotransmissores, propriamente ditos, o processo de disbiose gera um desequilíbrio em outros metabólitos intestinais, a citar os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), incluindo butirato, propionato e acetato, que também são neuroativos, modulando atividades cerebrais e o comportamentais (ZUBCEVIC et al., 2018).

Deste modo, a mudança de composição da microbiota intestinal acaba por influenciar também no desequilíbrio, ou modificações nos caminhos de sinalização para o SNC,

culminando no surgimento de transtornos de ansiedade e depressão (ZALAR; HASLBERGER; PETERLIN, 2018). Em relação ao perfil de microbiota em pacientes com transtornos depressivos, estudos demonstram que há um aumento significativo no número de bactérias pertencentes a ordem Bacteroidales e o menor número das bactérias da família Lachnospiraceae, em comparação com os indivíduos controle, e menor número de espécies da família Prevotellaceae (NASERIBAFROUEI et al., 2014). Enquanto que níveis mais elevados das bactérias dos filos Bacteroidetes, Proteobacteria e Acinobacteria e, ao mesmo tempo, um número significativamente menor de Firmicutes são observados nos pacientes com transtornos depressivos (JIANG et al., 2015). A diminuição da  $\alpha$ -diversidade também tem sido correlacionada com a presença de sintomas de depressão (KELLY et al., 2016).

Uma importante via de comunicação entre o cérebro e o intestino, pela qual muitos desses processos podem atuar, é por meio do nervo vago (YARANDI et al., 2016). O nervo vago (nervo craniano X) é o principal nervo da divisão parassimpática do sistema nervoso autônomo, sendo responsável por atividades como a regulação da homeostase metabólica; controle da frequência cardíaca; permeabilidade e motilidade intestinal; secreções gastrointestinais, endócrinas e pancreáticas; além de outras funções viscerais. Ademais, o nervo vago pode atuar em processos inflamatórios durante invasões teciduais provocadas por patógenos (PAVLOV; TRACEY, 2012).

As fibras aferentes vagais são distribuídas por toda parte externa da parede digestiva, de forma que sua interação com a microbiota intestinal ocorre de modo indireto, por meio da difusão de compostos ou metabólitos bacterianos, ou ainda por meio das células enteroendócrinas, localizadas no epitélio intestinal, que retransmitem sinais luminiais. Assim, as células enteroendócrinas são as principais participantes na detecção de conteúdo bacteriano luminal e produtos bacterianos que podem regular a motilidade gastrointestinal, secreção, ingestão de alimentos, através do seu efeito indireto sobre fibras aferentes vagais (ZUBCEVIC et al., 2018). A atuação do nervo vago é confirmada, uma vez que animais vagotomizados não foram responsivos aos estímulos gerados por neurotransmissores de origem microbiana (BRAVO et al., 2011).

Alguns processos intrínsecos podem causar o desequilíbrio do eixo cérebro-intestino, um desses processos é o envelhecimento do organismo. Em particular, o eixo HHA está profundamente perturbado, através de um ciclo de uma autoestimulação, que leva ao aumento da liberação basal de glicocorticóides e gera um *feedback* negativo. As disfunções do

eixo HHA têm sido associadas com declínio do volume do hipocampo e do desempenho cognitivo, e aumento do risco de depressão e ansiedade no final da vida. Também a interrupção do ritmo circadiano, típica do envelhecimento, pode estar envolvida neste processo, devido ao potencial efeito nas flutuações do nível de cortisol e, conseqüentemente, nas atividades microbianas do intestino (CANEVELLI *et al.*, 2018).

O envelhecimento do cérebro também é deficiente na síntese de BDNF, bem como outros neurotransmissores, incluindo serotonina e dopamina, todos os quais levam a disfunção neuronal e cognitiva (CANEVELLI *et al.*, 2018). O envelhecimento também é caracterizado pelo declínio progressivo função imunológica (imunosenescência) associada a uma inflamação crônica de baixo grau. Ambos os processos podem ter muitos efeitos sobre o SNC, como ativação microglial e aumento do dano oxidativo, que podem favorecer o surgimento de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, como a depressão (MAN; GICHEVA; NICOLETTI, 2014).

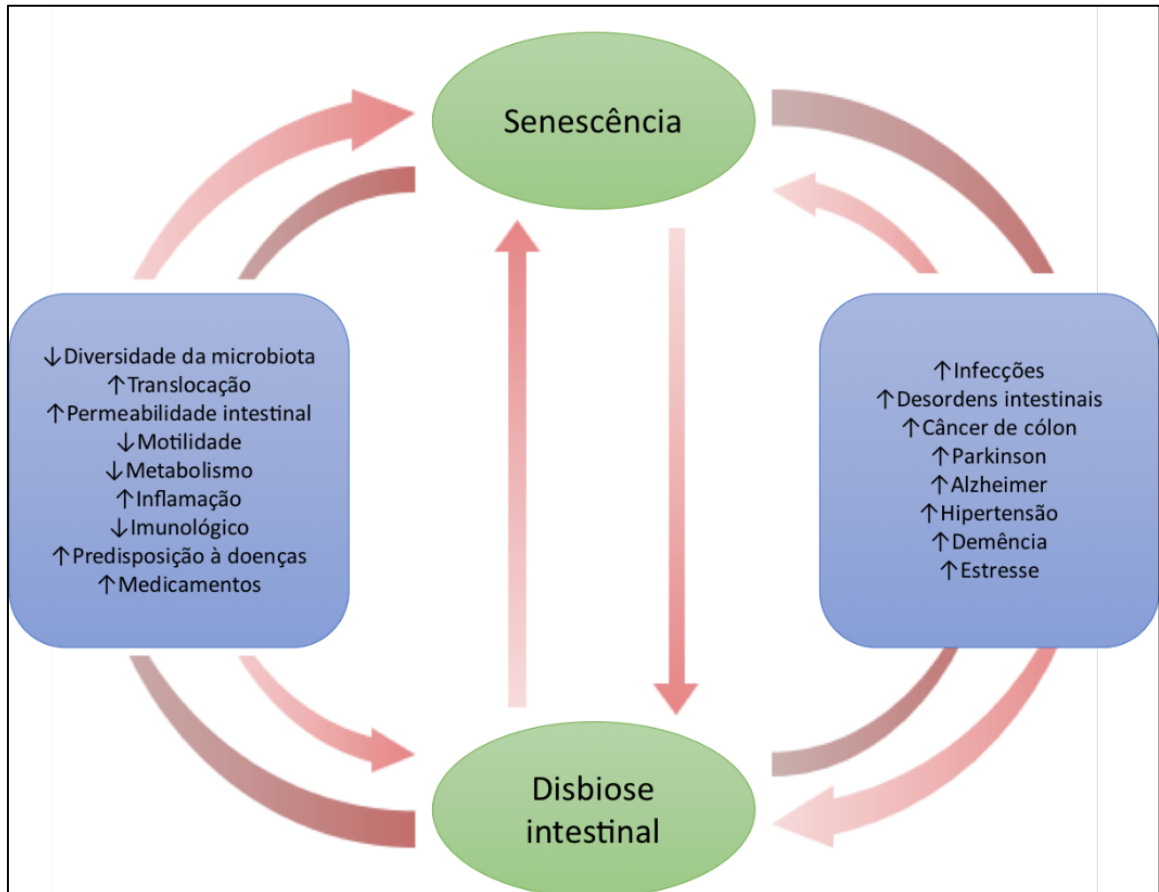
## **2.6 Acompanhando a senescência do hospedeiro**

Fisiologicamente, a senescência do organismo humano traz consigo duas mudanças intestinais relevantes: (a) declínio das funções das células de Paneth do intestino ocasionando diminuição da produção de peptídeos antibacterianos e da imunidade da mucosa mediada por IgA; (b) aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-6 e IL-8 (característica da fase senescente) e da permeabilidade da junção célula-célula, que tem sido especuladas como implicadas no aumento da vulnerabilidade a infecções, levando a um aumento da carga antigênica e conseqüente ativação imunológica sistêmica. Alteração da contratilidade da musculatura lisa e das inervações neurais das células do trato gastrintestinal de animais idosos também foram relatadas (MAN; GICHEVA; NICOLETTI, 2014).

Essas alterações podem predispor ao aparecimento de doenças crônicas relacionadas à idade, incluindo desordens cardiovasculares, infecções, doenças intestinais, doenças autoimunes, cânceres, diabetes, obesidade e doenças neurodegenerativas. A exposição concomitante a múltiplas drogas / antibióticos, que ocorre pela introdução de terapias com o passar da idade, juntamente com mudanças nos hábitos alimentares, geram perturbações na composição nas funções do microbioma intestinal (disbiose) (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). No

entanto, é difícil dizer se a disbiose intestinal é um fator agravante inicial ou consequência de distúrbios inflamatórios associados ao envelhecimento e à senescência (Figura 7).

Figura 7 - Conexão bidirecional entre a microbiota intestinal humano e o envelhecimento do hospedeiro.



Fonte: adaptado de Nagpal *et al.*, 2018.

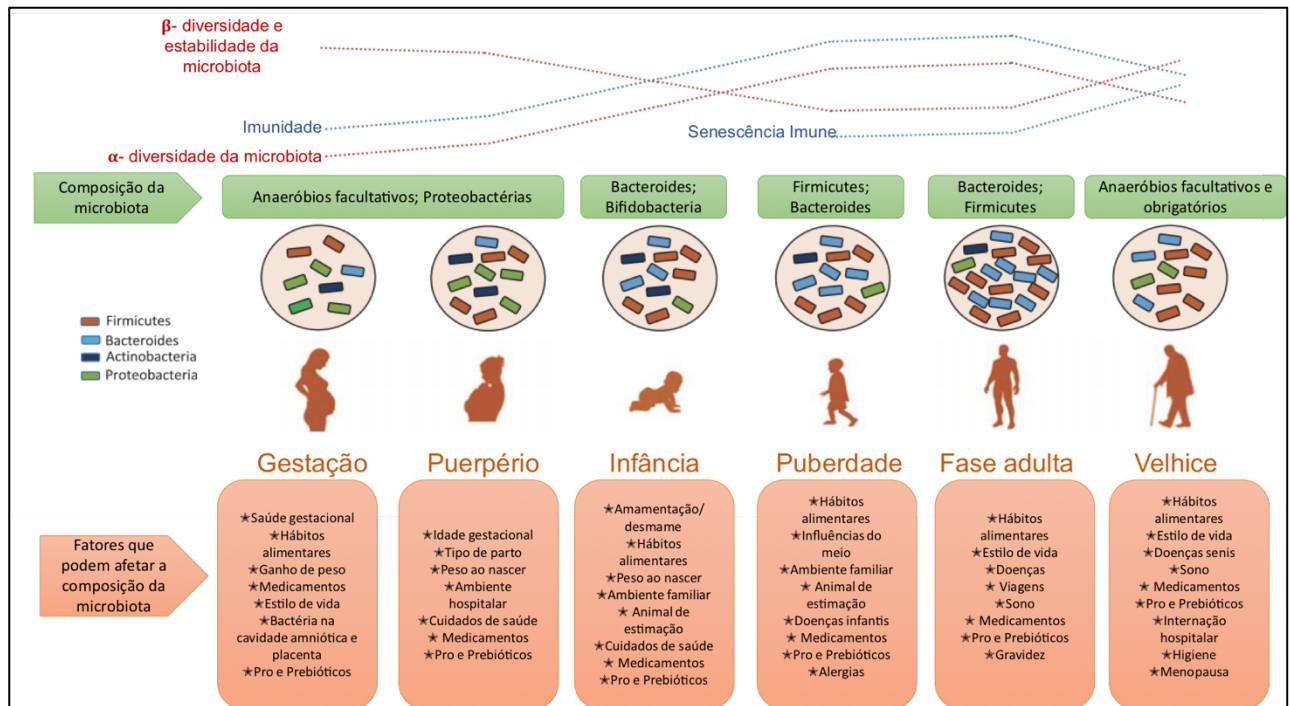
Sabe-se que, em comparação com indivíduos jovens, os idosos têm níveis mais baixos de AGCCs. Por exemplo, descobriu-se que uma produção intestinal reduzida de AGCC está correlacionada com uma menor ingestão de fibras e tratamento antibiótico durante a velhice (TIIHONEN; OUWEHAND; RAUTONEN, 2010). Essa redução dos níveis de AGCCs pode favorecer as populações intestinais de bactérias capazes de degradar a mucina, aumentando assim a ocorrência de translocação bacteriana.

A relação entre os distúrbios do sistema imune, presentes na velhice, e a composição da microbiota (Figura 8) pode ser apoiada pelas observações de que as bactérias comensais intestinais (*ex. Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Bacteroides sp.*), atuantes na manutenção da “imuno tolerância” intestinal, geralmente são reduzidas em pessoas idosas. No



outro extremo, as bactérias oportunistas, cuja abundância se eleva com a idade (filo Firmicutes), são conhecidos por estimular a inflamação intestinal (CLAESSON *et al.*, 2012).

Figura 8 - Composição da microbiota de acordo com os estágios da vida humana.



Alterações da microbiota relacionadas à idade e fatores que podem afetar a composição da microbiota em diferentes fases da vida.  $\alpha$ -diversidade: riqueza de espécies (taxon) em um único hospedeiro / ambiente microbiano;  $\beta$ -diversidade: diversidade na comunidade microbiana (perfis de abundância taxonômica) entre diferentes ambientes / amostras. Fonte: adaptado de Nagpal *et al.*, 2018.

Outro sistema em declínio funcional com a senescência do organismo é o sistema hematopoiético, resultando em imunossenescência, um aumento na incidência de anemia e malignidades mielóides (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

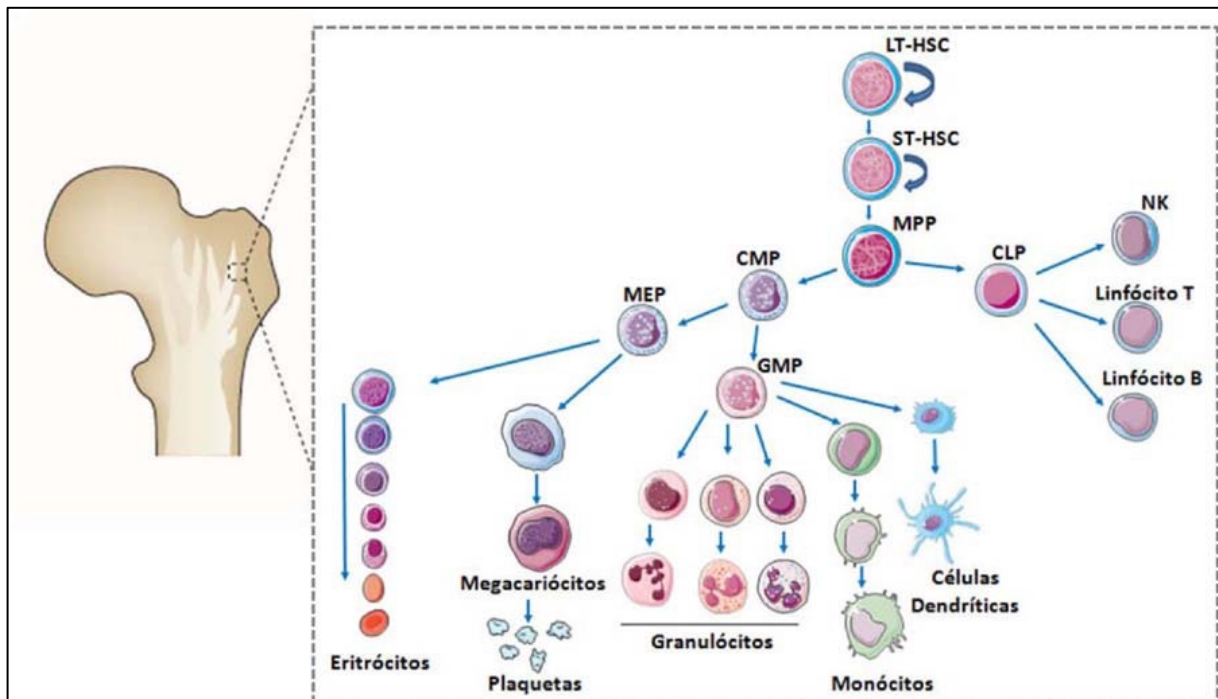
## 2.7 Hematopoiese

O microbioma influencia muitos processos biológicos, desde o desenvolvimento inicial do cérebro até o envelhecimento das células imunes inatas, como mostrado acima. Estudos recentes demonstraram que o microbioma bacteriano também desempenha um papel importante na hematopoiese normal (YAN; BALDRIDGE; KING, 2018).

A hematopoiese é um processo que ocorre com a célula-tronco hematopoiética (CTH) originando todas as demais células sanguíneas (Figura 9). O começo da cascata de diferenciação se dá com as células CTHs de longa duração (do inglês *long term hematopoietic*

*stem cell*; *LT-HSC*) originando uma CTH filha idêntica, essa última também possui capacidade de autorrenovação. Os componentes celulares da medula óssea regulam tal mecanismo. Além da autorrenovação, a LT-HSC também dá origem a CTH de curta duração (do inglês *short term hematopoietic stem cell*; *ST- HSC*) que é capaz de gerar o progenitor multipotente (do inglês *multi-potent progenitor*; *MPP*). O MPP se diferencia em progenitoras mielóides comuns (CMP), originando as linhagens mielóide, megacariocítica e eritrocítica; e progenitoras linfóides comuns (CLP), que originam a linhagem linfóide (LAURENTI; GÖTTGENS, 2018).

Figura 9 - Modelo hierárquico da hematopoiese.



Células-tronco pluripotentes se diferenciam progressivamente em progenitores até originarem as células sanguíneas maduras. **LT-HSC**= células- tronco hematopoiéticas de longa duração; seta indica autorrenovação. **ST-HSC**= células-tronco de curta duração. **MPP**= Progenitor Multipotente. **CMP**= Progenitor Mielóide Comum. **CLP**= Progenitor Linfóide Comum. **MEP**= Progenitor Megacariocítico-Eritroide. **GMP**= Progenitor de Granulócitos e Monócitos. *Fonte:* (FERRUCIO, 2015)

Sabe-se que patógenos desencadeiam distúrbios hematológicos e que a interrupção da homeostase na microbiota está associada a desfechos clinicamente significativos em pacientes com distúrbios hematológicos (YAN; BALDRIDGE; KING, 2018).

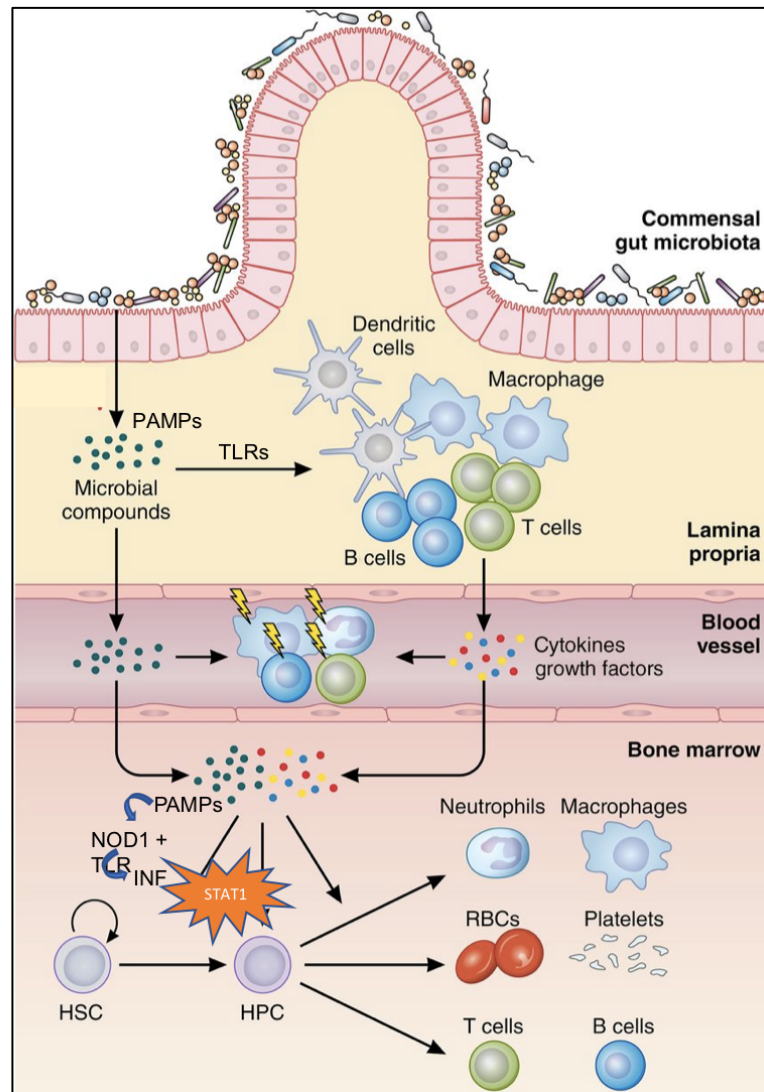
Corroborando com tal correlação, o tratamento antibiótico está amplamente associado ao aparecimento de anormalidades hematológicas. Citopenias, incluindo neutropenia (relatada após o uso de  $\beta$ -lactâmicos e sulfonamidas), anemia, trombocitopenia e pancitopenia, foram relatadas para uma ampla gama de antibióticos. Em resumo, síndromes de disbiose estão



relacionadas a defeitos hematológicos e 5% a 15% dos pacientes em tratamento com antibióticos em longo prazo são vulneráveis a complicações hematológicas adversas (YAN; BALDRIDGE; KING, 2018). Importante salientar que foi visto que concentrações plasmáticas elevadas de antibióticos não foram tóxicas para CTHs em condições de cultura *in vitro*, mostrando que não há um efeito antibiótico direto sobre as células hematopoiéticas, mas sim que os antibióticos prejudicam a hematopoiese de forma indireta pela depleção de bactérias intestinais (JOSEFSDOTTIR *et al.*, 2017).

Os mecanismos pelos quais essa modulação ocorre ainda não foram bem elucidados, no entanto, sugere-se que os produtos da microbiota intestinal possam entrar na corrente sanguínea e seguir para a medula óssea, onde promovem a produção de citocinas de crescimento que são essenciais para a hematopoiese normal. Em resumo, há o reconhecimento dos PAMPs pelo receptor do tipo TLR e, paralelamente, o ácido diaminopimérico (DAP), componente da parede celular bacteriana, ativa a via NOD1 nas células estromais. A via TLR e NOD1 partilham moléculas de sinalização semelhantes, tais como o fator-3 associado ao receptor de TNF (TRAF3), que sinaliza para a produção de interferon, que, por sua vez, ativa a via de sinalização JAK-STAT, que, por fim, acaba por ativar um perfil genético necessário para promover a hematopoiese (Figura 10) (YAN; BALDRIDGE; KING, 2018).

Figura 10 - Hematopoiese vs. microbiota.



Compostos da microbiota intestinal comensal estimulam linfócitos, macrófagos e células dendríticas na lâmina própria, que, em conjunto, produzem uma série de estímulos extrínsecos. Juntos, esses estímulos microbianos e celulares mantêm a atividade tônica de células-tronco hematopoiéticas (HSC) e células progenitoras hematopoiéticas (HPC), bem como linfócitos, monócitos e neutrófilos. Assim, os compostos microbianos promovem a hematopoiese em estado estacionário e a vigilância do sistema imune inato e adaptativo contra infecções bacterianas e virais. Fonte: Josefsdottir et al., 2016.

## 2.8 Síndrome Mielodisplásica

O envelhecimento das células-tronco hematopoiéticas (CTHs) acaba por gerar a produção de mais células mielóides, se comparadas às células linfóides. Tal fato resulta na diminuição da resposta imune adaptativa no organismo dos idosos (GROVER *et al.*, 2016).

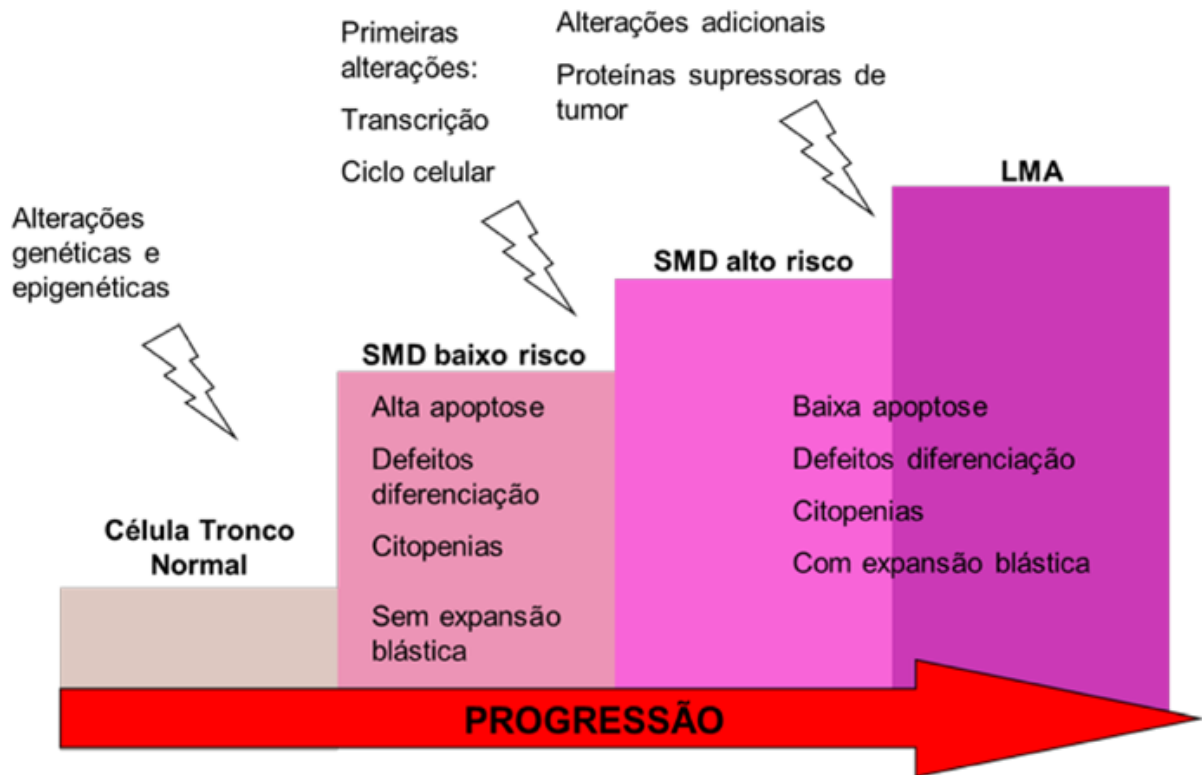
Neste contexto do avanço da idade e suas consequências, a Síndrome Mielodisplásica (SMD) é uma doença hematopoiética de caráter maligno, ocasionado pela geração de clones das células progenitoras hematopoiéticas (CPH). Acarretando em displasias em uma ou mais linhagens celulares, citopenia(s) no sangue periférico, hiperplasticidade da medula óssea (MO), e aumentando o risco de evoluir para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (HAMID; AL-NEHMI; SHUKRY, 2019).

A incidência da doença está relacionada com o aumento da idade, havendo 6 vezes maior incidência entre pacientes com mais de 80 anos, se comparados aos pacientes com menos de 60 anos (HAMID; AL-NEHMI; SHUKRY, 2019). Em relação ao gênero, notou-se relação significativa da incidência maior em homens (CHAMSEDDINE *et al.*, 2016).

Divide-se a SMD em SMD primária (*de novo*) (85% a 90% dos casos) e SMD secundária. A SMD primária é de causa idiopática, uma vez que não foram encontradas correlações significativas entre a doença e alguma predisposição do portador. Por sua vez, a SMD secundária ocorre entre 10% a 15% dos casos principalmente após tratamento quimioterápico ou radioterápico. Profissionais da agricultura que se expõem cronicamente aos agentes tóxicos ambientais (pesticidas, solventes e benzeno); ou indivíduos tabagistas também estão mais predispostos a SMD secundária (MA, 2012). Ocorrendo assim a lesão do DNA das células tronco hematopoiéticas (CTH), levando ao aparecimento de um clone anormal precursor de células hematopoiéticas disfuncionais e morfologicamente displásicas (CHAMSEDDINE *et al.*, 2016).

De forma interessante e contraditório, na SMD, visualiza-se hiperplasticidade medular em contraste com citopenia no sangue periférico, isso se deve a hematopoiese ineficaz característica da doença. Observa-se que o clone displásico torna-se resistente à apoptose, enquanto o clone progenitor mielóide, defeituoso, está mais sujeito a tal processo. Esse fato pode inclusive explicar as ocorrências de progressão para LMA (Figura 11) (CHAMSEDDINE *et al.*, 2016).

Figura 11 - Esquema da patogênese da SMD.



Os danos iniciais na CTH podem ser causados por agentes químicos, radiação, drogas citotóxicas ou mutações randômicas. As primeiras alterações podem afetar o controle do ciclo celular e a transcrição de supressores tumorais resultando na expansão clonal. A última fase é caracterizada pela diminuição da apoptose e pelo aumento da proliferação celular. Fonte: Ferruccio, 2015.

Diversos sistemas de classificação têm sido propostos para a SMD. A classificação tem como intuito categorizar os pacientes de acordo com as variáveis clínicas, facilitando e padronizando a escolha dos esquemas terapêuticos, a análise do prognóstico e do possível risco de transformação para LMA. O termo “Síndrome Mielodisplásica” foi primeiramente utilizado em 1982 em uma revisão da classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) publicada em 1976 (BENNETT *et al.*, 1976). Esse sistema era baseado unicamente em critérios morfológicos, onde era observada a presença de linhagens celulares afetadas por displasias e pela porcentagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea. Essa classificação foi dominante até os anos 2000.

Criada em 2001, revisada em 2008 (SWERSLOW, 2008) e atualmente utilizada, a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Tabela 1) torna-se mais completa do que a classificação FAB, uma vez que houve a inclusão de critérios clínicos, morfológicos, e citogenéticos para o diagnóstico (SWERDLOW *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Classificação clínica da SMD segundo OMS 2008.

SUBTIPO	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
CRDU (AR, NR, TR)	<1% blastos; uni ou bicitopenia	<5% blastos Displasia em uma única linhagem
ARSA	Anemia; ausência de blastos	<5% blastos ≥15% sideroblastos em anel Displasia apenas eritróide
CRDM	Citopenia(s); Ausência de bastonetes de Auer; <1% blastos	Displasia em 2 ou mais linhagens <5% blastos Ausência de bastonetes de Auer
AREB I	Citopenia(s); Ausência de bastonetes de Auer; <5% blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens 5-9% blastos Ausência de bastonetes de Auer
AREB II	Citopenia(s); Pode haver bastonetes de Auer; 5-19% blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens 10-19% blastos Presença de bastonetes de Auer

CRDU (Citopenia refratária com displasia unilinhagem, AR (Anemia refratária), NR (Neutropenia refratária), TR (Trombocitopenia refratária), ARSA (Anemia refratária com sideroblastos em anel), CRDM (Citopenia refratária com displasia multilinhagem), AREB (Anemia refratária com excesso de blastos).

Lançando mão de técnicas moleculares para diagnóstico clínico de doenças, a OMS analisou novamente sua classificação em 2016 e adicionou um parâmetro molecular (mutação no gene *SF3B1*) na definição do subgrupo ARSA, sendo chamado atualmente de SMD com sideroblastos em anel. Ademais, houve a substituição dos termos “anemia refratária” e “citopenia refratária” por “Síndrome Mielodisplásica com displasia unilinhagem” e “Síndrome Mielodisplásica com displasia multilinhagem” (Tabela 2). Além desses sistemas de classificação, os pacientes com SMD também são frequentemente classificados em alto e baixo risco, com base na probabilidade de sua transformação em LMA (CHAMSEDDINE *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Classificação clínica da SMD segundo OMS 2016.

SUBTIPO	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
SMD com displasia de uma única linhagem (SMD-DU)	uni ou bicitopenia	Displasia unilinhagem < 5% blastos
SMD com displasia de múltiplas linhagens (SMD-DM)	citopenia(s) Monócitos < 1.000/mm <sup>3</sup>	Displasia em ≥2 linhagens < 5% blastos
SMD com sideroblastos em anel Com displasia de única linhagem (SMD- SA-DU)	anemia, sem blastos	≥15% sideroblastos em anel ou ≥ 5% sideroblastos com mutação SF3B1 e < 5% blastos
Com displasia de múltiplas linhagens (SMD-SA-DM)		Displasia unilinhagem Displasia em ≥2 linhagens
SMD com excesso de blastos-1 (SMD-EB 1)	citopenia(s) monócitos < 1.000/mm <sup>3</sup> < 5% blastos	Displasia uni ou multilinhagem 5-9% blastos sem bastonetes de Auer
SMD com excesso de blastos-2 (SMD-EB 2)	citopenia(s) monócitos < 1.000/mm <sup>3</sup> 5-19% blastos	Displasia uni ou multilinhagem 10-19% blastos ±Auer
SMD inclassificável	Citopenias ±1% de blastos em 2 ocasiões	sem displasia ou displasia única linhagem, mas com citogenética característica, < 5% blastos
SMD com del 5q- isolada	anemia, plaquetas normais ou aumentadas	displasia eritroide, 5q- isolado ou com mais uma anormalidade que não -7/7q- < 5% blastos

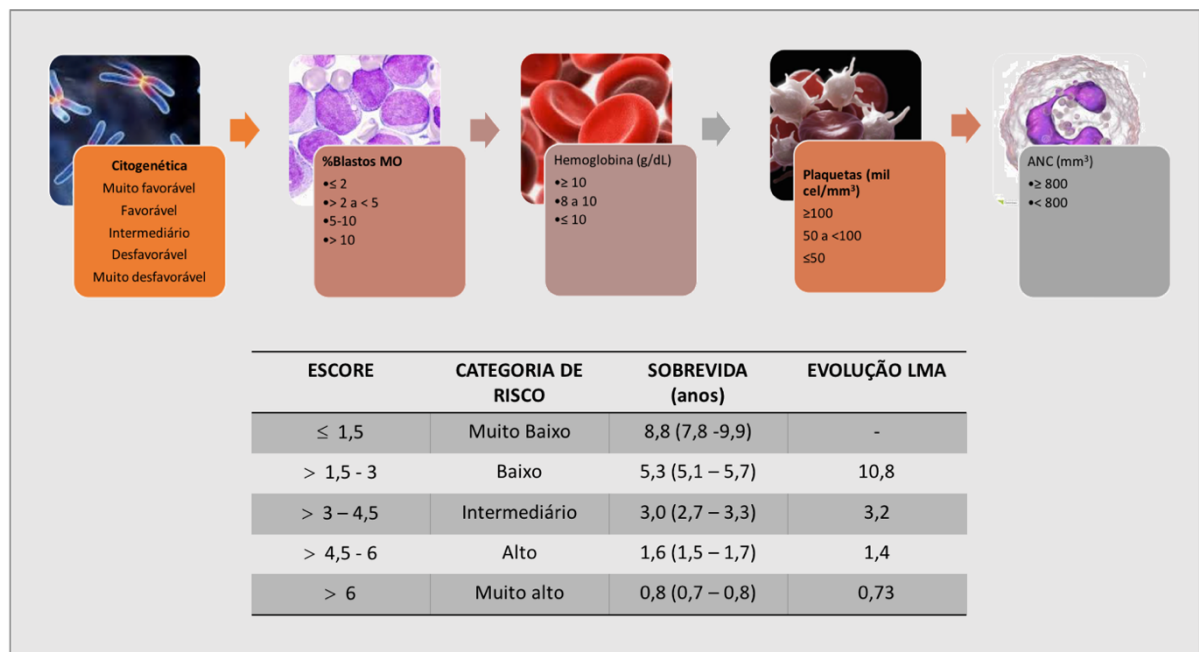
Tentando prever uma possível progressão para LMA, em 1997, Greenberg e colaboradores criaram o Índice Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD. Esse índice é um tipo de estratificação prognóstica que permite predizer o risco de transformação leucêmica, bem como estimar a sobrevida para cada paciente. Neste sistema, são consideradas variáveis como: porcentagem de blastos da MO, o número de citopenias periféricas e o cariótipo; que conferem pontuações que são somadas a fim de se obter um valor numérico de IPSS. Após alcançar esse valor numérico, os pacientes são categorizados em quatro grupos de risco: baixo (pontuação 0), intermediário-I (pontuação de 0,5-1), intermediário-II (pontuação de 1,5 a 2,0) e elevado (pontuação > 2,5) (Figura 12) (GREENBERG *et al.*, 1997).

Uma revisão, incluindo uma melhor estratificação da porcentagem de blastos, e o número de citopenias, que foi substituído pelo grau de citopenias, deu origem ao IPSS-R (revisado) em 2010. Foram criadas assim cinco categorias de risco: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto risco (GREENBERG; TUECHLER, 2012).

Juntamente com as atualizações da OMS, o IPSS auxiliam na escolha da conduta terapêutica, que pode ser de caráter paliativo (suporte transfusional) ou o transplante alogênico

de medula óssea, considerada a única forma de cura para a SMD (JONAS; GREENBERG, 2014).

Figura 12 - Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R.



ANC – *Absolut neutrophil count*. Fonte: adaptado de Bejar *et al.*, 2014.

A conduta terapêutica permanece baseada no IPSS. Em pacientes classificados como alto ou intermediário risco no IPSS apresentam sobrevida média de apenas 12 meses se não tratados. Nesses casos, o tratamento deve ter como objetivo modificar o curso da doença, evitando a progressão para LMA e prolongando a sobrevida. Por outro lado, naqueles classificados como baixo ou intermediário risco no IPSS possuem sobrevida mais longa e muitos pacientes morrem por outras causas que não as decorrentes da SMD. Para esses pacientes, o tratamento visa, principalmente, amenizar as consequências das citopenias, com o uso de agentes estimuladores da eritropoiese (EPREX – alfaepoetina), e transfusões a fim de melhorar a qualidade de vida. (L. ADÈS, R. ITZYKSON, 2008).

O uso dos agentes hipometilantes, azacitidina e citarabina, tornou-se o tratamento de primeira linha em pacientes jovens SMD de alto risco. Muitos desses apresentam dependência transfusional por longos prazos. Sabe-se que a sobrecarga de ferro nesses pacientes pode gerar efeitos colaterais ainda não bem definidos. Por isso a importância do uso de alternativas terapêuticas que reduzam a necessidade transfusional (L. ADÈS, R. ITZYKSON, 2008).

Além dos efeitos colaterais esperados pelo uso de quimioterápicos, essas medicações podem influir na saúde do organismo de maneira mais indireta. Estudos estão em consonância com a suposição que os tratamentos quimioterápicos interrompem a homeostase da microbiota intestinal, permitindo o crescimento excessivo de bactérias patogênicas que acabam exacerbando ou perpetuando a lesão intestinal induzida pela quimioterapia (PANEBIANCO; ANDRIULLI; PAZIENZA, 2018).

Como novo perfil de microbiota intestinal, em decorrência da quimioterapia, observou-se que os filos Firmicutes e Bacteroidetes foram sub-representados no intestino de camundongos receptores de gemcitabina (quimioterápico), cujo perfil bacteriano foi deslocado em favor de outros dois filos, Proteobacteria (principalmente *E. coli*) e Verrucomicrobia (principalmente *A. muciniphila*), que são geralmente menos abundantes (PANEBIANCO *et al.*, 2018). De modo interessante, pode-se supor que o aumento de *A. muciniphila*, bactéria responsável pela degradação e manutenção da camada de mucina na parede intestinal, possa exacerbar a mucosite observada como efeito adverso de terapias quimio e radioterápicas (VAN VLIET *et al.*, 2010).

Além do impacto na eficácia da quimioterapia, pacientes podem apresentar perfis de microbiota intestinal que favoreçam ou não a eficácia do tratamento. Há relatos de que as bactérias também podem modular a toxicidade do medicamento e seus efeitos colaterais. Verificou-se que as bactérias pertencentes à classe Gammaproteobacteria conferem resistência à gemcitabina, por serem capaz de transformar esse medicamento em seu metabólito inativo. Curiosamente, em um modelo de camundongo com câncer de cólon, a resistência à gencitabina causada por Gammaproteobacteria foi revertida pela co-administração de antibiótico, apoiando assim o papel dessas bactérias na falha na resposta ao fármaco (PANEBIANCO; ANDRIULLI; PAZIENZA, 2018).

Este feedback entre mudança da composição do microambiente intestinal causada pela quimioterapia *versus* a interferência de grupos bacterianos específicos na resposta ao tratamento quimioterápico, precisa ser melhor elucidado em humanos. Tal esclarecimento pode trazer à tona intervenções alternativas (uso de pré e probióticos) que melhorem a resposta do paciente e conseqüentemente seu prognóstico (PANEBIANCO; ANDRIULLI; PAZIENZA, 2018).

Embora os eventos relacionados à patogênese da SMD sejam provenientes de defeitos moleculares nas células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, vale ressaltar que a



hematopoiese ineficaz encontrada na doença pode ser intensificada por anormalidades provindas de outros microambientes, uma vez que a causa da SMD *de novo* é idiopática. Além disso, as diferentes respostas aos tratamentos, incluindo à quimioterapia, bem como os prognósticos variáveis, podem estar associados às demais características que não as avaliadas rotineiramente no decorrer do manejo clínico. Assim, torna-se interessante avaliar o perfil da microbiota intestinal dos pacientes com SMD, buscando uma correlação dos achados com os principais parâmetros clínicos da doença e com o prognóstico desses pacientes.

### 3 HIPÓTESE CIENTÍFICA

- Distúrbios de caráter hematopoiético podem estar interligados às mudanças na composição da microbiota intestinal;
- Os pacientes portadores da Síndrome Mielodisplásica (SMD) apresentam perfil de microbiota peculiar;
- Os perfis de microbiota intestinal estão associados aos quadros clínicos, resposta ao tratamento e ao prognóstico dos pacientes portadores da SMD;
- Os sintomas de depressão estão associados às alterações na composição da microbiota intestinal, podendo influenciar no quadro clínico e prognóstico dos pacientes portadores da SMD.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Caracterizar a microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome Mielodisplásica (SMD), buscando associar os perfis de microbiota encontrados com o quadro e desfecho clínico dos pacientes, bem como com a presença de sintomas de depressão.

### 4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a microbiota intestinal de pacientes portadores de SMD;
- Caracterizar a microbiota intestinal de idosos sadios, acompanhados pela Geriatria do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC);
- Comparar os perfis de microbiota dos indivíduos sadios e doentes;
- Buscar um padrão de microbiota característico dos subgrupos: AR, ARSA, CRDM e AREB;
- Buscar um padrão de microbiota característico dos subgrupos de baixo e alto risco (IPSS) de transformação para Leucemia Mielóide Aguda;
- Avaliar se há correlação entre grupos de bactérias mais abundantes na microbiota intestinal e os parâmetros clínico da doença (dependência transfusional, cariótipo, hemograma, uso de hipometilantes, dentre outros);
- Estudar uma possível associação entre a composição da microbiota com o estado nutricional e hábitos dos indivíduos;
- Verificar se existe relação entre a abundância do gênero *Akkermansia* sp. e o parâmetros clínicos dos indivíduos;
- Buscar correlações entre a presença de sintomas de depressão e os perfis de microbiota encontrados.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Pacientes

A coleta das amostras foi realizada no Ambulatório de Citopenia do Idoso, ligado ao Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará, onde havia o atendimento aos pacientes com Síndrome Mielodisplásica. Foram incluídos no estudo 30 pacientes, acompanhados mediante diagnóstico da doença. Como grupos controle, foram incluídos 16 idosos que participam das pesquisas, bem como das terapias ocupacionais desenvolvidas pelo HUWC, para tanto os idosos passam por triagem prévia a fim de verificar doenças pré-existentes. Sem alterações hematológicas, os idosos estavam aptos a participarem deste estudo.

Para a posterior realização dos experimentos, houve a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e preenchimento de questionários sobre os hábitos alimentares (realizado pela nutricionista colaboradora) e as medicações utilizadas.

No momento da entrevista da psicóloga Monique Braz realizou a avaliação psicológica por meio da avaliação da escala de inventário de depressão BECK (anexo I), a fim de identificar sintomas de depressão. Este é um questionário aplicado para a medida da intensidade da depressão, sendo muito utilizado na área clínica e na pesquisa. O questionário é de caráter autoavaliativo, composto por 21 itens, cada um com 4 alternativas com escores de 0 a 3 que subentendem graus crescentes da depressão. Os 21 itens referem-se a tristeza, pessimismo, sentimento de fracasso, insatisfação, punição, autoaversão, ideias suicidas, choro, irritabilidade, retraimento social, indecisão, mudança na autoimagem, dificuldade de trabalhar, insônia, fadigabilidade, perda de apetite e peso, preocupações somáticas e perda de libido. O escore total permite a classificação dos níveis de intensidade da depressão, que varia entre depressão mínima (0- 9), depressão leve (10-16), depressão moderada (17-29) e depressão severa (30-63) (GANDINI *et al.*, 2007).

Posteriormente aos questionários, os participantes foram instruídos quanto ao procedimento correto da coleta da amostra fecal, bem como de sua conservação até a entrega da mesma aos pesquisadores.

## **5.2 Critérios de inclusão e exclusão**

Pacientes de 45 a 95 anos com ou sem sintomas de depressão, leve a moderada, e portadores da Síndrome Mielodisplásica foram incluídos no estudo.

Foram excluídos da pesquisa os pacientes com idade fora da faixa etária de inclusão, paciente com cardiopatia, pneumopatia, hepatopatia, histórico de alcoolismo, transtornos psiquiátricos diversos (demência ou bipolaridade). Os pacientes que tenham feito uso de antibiótico nos últimos 30 dias antes da consulta também foram excluídos do estudo. Indivíduos com remissão do transtorno depressivo unipolar, com transtorno do tipo grave ou com algum tipo de demência não entraram na pesquisa, a fim de evitar dúvidas na interpretação dos resultados.

## **5.3 Aspectos éticos**

Esse estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética CEP/ UFC/PROPESQ (CAAE: 58761816.2.0000.5054) e do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (número: 58761816.2.0000.5054) (anexo II) e os procedimentos realizados seguiram as normas estabelecidas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que orienta os estudos com seres humanos. O estudo foi explicado cuidadosamente aos participantes e/ou a seus familiares durante a consulta médica, posteriormente foi obtido um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, apêndice I). O estudo não impôs riscos aos participantes, uma vez que sua participação consiste em ceder uma única amostra fecal, coletada em seu domicílio. A autonomia dos participantes foi respeitada, sendo possível a desistência em qualquer momento da pesquisa. Vale salientar que a coleta amostral condizia com um número muito maior de participantes, no entanto, houve desistências após a entrevista e na entrega da amostra fecal. A confidencialidade dos dados dos pacientes foi respeitada ao longo de toda a pesquisa e após o seu término.

## 5.4 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

### 5.4.1 *Dados do paciente, classificação da SMD e prognóstico*

- Grupo: Caso e controle
- Sexo: masculino e feminino;
- Idade
- Classificação da OMS (2008): CRDU (Citopenia Refratária com Displasia de Única Linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos I), AREB II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos II), t-SMD (SMD Secundária ao tratamento), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica);
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Dependência Transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005);
- Tratamento com hipometilante: sim e não;

### 5.4.2 *Celularidade da medula óssea e cariótipo*

- Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hiper celular;
- Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- Displasias na medula óssea: 0, 1 displasia, 2 displasias e 3 displasias;
- Diseritropoiese: Presença e Ausência;
- Disgranulopoiese: Presença e Ausência;
- Dismegacariopoiese: Presença e Ausência;
- Sideroblastos em anel: Presença e Ausência;
- Faixas de porcentagens de Sideroblastos em anel: 0, 1-14% e >15%;

- Porcentagens de Blastos categorizada: <10% e >10%;
- Cariótipo - Quanto à alteração: normal e alterado;

#### **5.4.3 Hemograma**

- Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R):  $\geq 10\text{g/dL}$ ,  $8\text{-} < 10\text{g/dL}$  e  $< 8\text{g/dL}$  (valores de referência: 11,5 a 16,4 g/dL);
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R):  $\geq 800$  e  $< 800$  / $\mu\text{L}$  (valores de referência: 2000 – 7000 / $\mu\text{L}$ );
- Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R):  $\geq 100.000$ ,  $50.000 - 100.000$  e  $\leq 50.000$  / $\mu\text{L}$  (valores de referência: 150000 – 450000 / $\mu\text{L}$ );
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico: 0/1 citopenia e 2/3 citopenias;

#### **5.4.4 Dados nutricionais**

- Peso
- IMC
- Gordura corporal
- Fumante
- Etilista
- Atividade física
- Hábito intestinal

#### **5.4.5 Variáveis analisadas após sequenciamento**

Para otimizar a busca por correlações entre os dados de sequenciamento e os achados clínicos, foram escolhidas as variáveis de maior relevância prognóstica. Sendo essas:

##### **5.4.5.1 Variáveis clínicas:**

- OMS 2008
- Cariótipo

- IPSS
- Uso de hipometilante
- Dependência transfusional
- Hemograma (hemoglobina, neutrófilos e plaquetas)

#### 5.4.5.2 Variáveis nutricionais:

- % gordura corporal
- Fumo
- Etilismo

A presença de sintomas de depressão também foi abordada como variável de análise.

## 5.5 Avaliação Nutricional

Após responderem os questionários, os pacientes que aceitaram participar da pesquisa foram avaliados segundo os critérios nutricionais. Para tanto, foi realizada a antropometria e o recordatório alimentar dos pacientes.

### 5.5.1 Antropometria

As variáveis antropométricas avaliadas foram: Índice de Massa Corporal (IMC), Percentual de Gordura Corporal (%GC), Circunferência da Cintura (CC).

Peso e altura foram realizados através de métodos convencionais, com auxílio de estadiômetro e balança antropométrica. O IMC foi determinado a partir da seguinte equação:  $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{altura}^2 (m^2)$ . Pacientes com valores de  $IMC \geq 30 \text{kg/m}^2$  foram considerados obesos. Valores de  $CC \geq 102 \text{ cm}$  (homens) e  $\geq 88 \text{ cm}$  (mulheres) foram considerados elevados (NHLBI, 2002).

O %GC foi avaliado utilizando as medidas das dobras cutâneas tricipital, bicipital, supreilíaca e subescapular. Foi utilizado um adipômetro científico da marca Cescof®. Percentual de gordura corporal  $>25\%$  (homens) ou  $>35\%$  (mulheres) foi considerado elevado (CHUMLEA *et al.*, 2002).



### **5.5.2 Consumo Alimentar**

O consumo alimentar foi avaliado através da aplicação e análise de dois recordatórios de 24h. A classificação do consumo médio dos macronutrientes (calorias, carboidratos, fibras, proteínas, lipídeos e gorduras mono, poli e saturada) e micronutrientes (vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B6, vitamina B9, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, cálcio, ferro, zinco, cobre, selênio, magnésio e manganês) foi realizada de acordo com o preconizado pelas *Dietary reference Intakes* (DRIs) (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006).

### **5.6 Amostras de sangue e medula óssea**

Por colaboração, a Citogenética foi realizada pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica descrita por Chauffaille com adaptações (PINHEIRO; CHAUFFAILLE, 2009).

Para realização do hemograma, uma enfermeira devidamente treinada coletou amostras de sangue, por venopunção periférica em pacientes submetidos a jejum de 12 h, utilizando-se sistema de coleta a vácuo. O exame foi realizado no próprio HUWC e seus resultados foram anexados aos prontuários dos referentes pacientes.

### **5.7 Coleta e tratamento das amostras fecais**

Após a entrevista, o paciente era orientado recebia um informativo de como a amostra deveria ser coletada, juntamente com um frasco estéril de coleta.

A fim de minimizar os contratempos e inconvenientes para o paciente, era especificado que a amostra deveria ser entregue na data do retorno do paciente para a próxima consulta de rotina. Era informado também que o paciente só deveria realizar a coleta da amostra no máximo um dia antes do retorno e acondicioná-la conforme explicado no papel informativo.

As amostras foram transportadas em caixa de gelo até o acondicionamento final no laboratório, sem exceder 4 horas neste ínterim. Ao chegar ao laboratório, as amostras eram aliquotadas na forma de réplicas e acondicionadas em freezer a -80 °C até análises posteriores.

## 5.8 Testes laboratoriais

### 5.8.1 Extração de DNA

A extração de DNA se deu por meio do kit QIAamp<sup>®</sup> Fast DNA Stool Mini Kit QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

Com intuito de otimizar a extração, seguiu-se protocolo estabelecido por Thomas, Clark, & Doré, 2015, no qual foi utilizado 0.3 g de beads de vidro de 0.1 mm (BioSpec, Bartlesville, OK, USA) a 200mg cada amostra fecal fresca, juntamente com tampão de lise (ATL, QIAamp), seguido por homogeneização no MiniBeadBeater (BioSpec). Após homogeneização houve a incubação do material à 95 °C para a finalização da lise celular.

Depois dessa etapa, o DNA foi extraído e purificado utilizando o kit QIAamp<sup>®</sup> conforme especificado pelo fabricante.

Basicamente, o protocolo segue as seguintes etapas: homogeneização em tampão de lise (ATL); aquecimento (70°C/5 min); adição de InhibitEX para adsorção de inibidores componentes na amostra; centrifugação (12.000 rpm/4 min); digestão enzimática com proteinase K e tampão AL; incubação (70°C/10 min); precipitação com etanol absoluto; transferência para coluna de sílica; centrifugação (14.000 rpm/1 min); lavagem com tampão AW1; centrifugação (14.000 rpm/1 min); lavagem com tampão AW2; centrifugação (14.000 rpm/3 min); eluição do DNA com tampão AE, com o menor volume possível para evitar que ocorra a diluição demasiada do DNA recém extraído.

O DNA extraído foi avaliado para verificar sua qualidade (concentração e razões 260/280, 260/230). Para tanto, foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e a quantificação foi feita por fluorômetro Qubit<sup>®</sup> 2.0 utilizando o kit dsDNA BR Assay (Invitrogen <sup>TM</sup>). O DNA extraído foi armazenado a -20°C para posterior análise.

## 5.9 Sequenciamento e análise dos dados

A integridade do DNA também foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% com tampão 1 × TAE. A biblioteca dos *amplicons* foi amplificada usando os iniciadores específicos da região (515F / 806R), que têm como alvo a região V4 do 16S rDNA. A

amplificação do primeiro passo compreendeu 25  $\mu\text{L}$  de reação contendo os seguintes reagentes: 14,8  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease (Certified Nuclease-free, Promega, Madison, WI, EUA), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação de alta fidelidade 10x (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  50 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer (concentração 10  $\mu\text{M}$ , concentração final 200 pM), 1,0 unidade da Taq Polimerase High Fidelity Platina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 4,0  $\mu\text{L}$  de DNA (10 ng). As condições para PCR foram: 94 ° C por 240 s para desnaturar o DNA, com 35 ciclos a 94 ° C por 45 s, 50 ° C por 60 s, e 72 ° C por 180 s, com uma extensão final de 600 s a 72 ° C. Na segunda etapa, os produtos de PCR foram limpos com esferas de purificação da Agencourt AMPure XP - PCR (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), de acordo com o manual do fabricante. Para indexação, um par específico de índices Illumina Nextera XT (Illumina, San Diego, CA) foi adicionado a ambas extremidades dos produtos amplificados. Cada reação de 50  $\mu\text{L}$  continha o seguinte: 23,5  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease (Certified Nuclease-livre, Promega, Madison, WI, EUA), 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão 10x de PCR de alta fidelidade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 4,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  25 mM, 1,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 mM cada), 5,0  $\mu\text{L}$  de cada índice Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EUA), 1,0 unidade de Taq Polimerase High Fidelity Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5,0  $\mu\text{L}$  de cada produto da PCR anterior. As condições para este segundo ciclo de PCR foram as seguintes: 95 ° C por 180 s para desnaturar o DNA, com 12 ciclos a 95 ° C por 20 s, 55 ° C por 30 s, e 72 ° C por 1800 s, com uma extensão final de 300 s a 72 ° C.

Após a indexação, os produtos de PCR foram limpos, como descrito anteriormente, e quantificados usando o kit de ensaio dsDNA BR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em um fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Uma vez quantificados, foi realizada a normalização das amostras de DNA a fim de deixar todas em uma concentração equimolar (16nM). Paralelamente, preparou-se o Phix (Illumina, San Diego, CA, USA), uma espécie de controle positivo do sequenciamento, diluindo-o para concentração de 12pM e desnaturado da mesma maneira que o pool das amostras. Com as bibliotecas já equilibradas para a concentração ideal (confirmada em fluorômetro Qubit® 2.0), dosou-se a quantidade de Phix a ser utilizada. Salientando-se que se seguiu orientação técnica, a qual afirma que para biblioteca de baixa diversidade, tal como 16S, é recomendado o uso de 20% do controle positivo. Após a quantificação em fluorômetro Qubit® 2.0, a molaridade do pool foi determinada e diluída a 4 nM, desnaturada com NaOH 0,2N, e então diluída para uma concentração final de 10 pM

juntamente com PhiX a 20% para carregamento no sequenciador MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA).

Os primers das sequências já demultiplexadas (*i.e.* cada sequência com a identificação de sua amostra) foram removidos usando o *software* Cutadapt v1.8, em modo *paired-end*, e a o perfil de qualidade destas foi avaliada usando os *softwares* FastQC v.0.11.8 (MARTIN, 2013) e vsearch v2.10.4 (ROGNES *et al.*, 2016). Análises subsequentes foram realizadas no ambiente R v3.5.3 (R Development Core Team, 2016), seguindo as recomendações dos autores do pacote DADA2 v1.11.1 (CALLAHAN *et al.*, 2016) e ajustando os parâmetros para os nossos dados. O produto deste *pipeline* é uma tabela não-quimérica de variantes de sequência de amplificação (ASVs) (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017) que registra o número de vezes que cada ASV (sequências com diferença de até um nucleotídeo) foi observado em cada amostra. A atribuição de taxonomia aos ASVs representativos foi realizada por algoritmo DADA2 específico para esta função, utilizando-se do banco de dados SILVA 132 (CALLAHAN, 2018) como referência. As demais análises foram realizadas utilizando os pacotes phyloseq v1.26.1 (MCMURDIE; HOLMES, 2013) e vegan v 2.5.4 (OKSANEN *et al.*, 2019) e as representações gráficas foram realizadas com ggplot2 v3.1 (WICKHAM, 2009).

### 5.9.1 Análises da $\alpha$ -diversidade e riqueza

A  $\alpha$ -diversidade refere-se à variedade e à complexidade das espécies em um único hospedeiro / ambiente microbiano (NAGPAL *et al.*, 2018).

Para análise da diversidade foram utilizados os índices de Shannon e Simpson. O índice de diversidade e equidade de Shannon mensura o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido, de maneira aleatória, em relação a uma amostragem única composta por S espécies e N indivíduos, portanto, explica a abundância e a uniformidade. Assim, quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza, ou seja, a diversidade da amostra é baixa (URAMOTO *et al.*, 2005).

O índice de Simpson reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente na comunidade pertencerem a uma mesma espécie. O resultado varia de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior será a dominância de uma determinada espécie presente e,

consequentemente, menor será a diversidade da comunidade em questão (URAMOTO et al., 2005).

Para a análise da riqueza foi utilizado índice de Chao1, que mensura o número total de espécies presentes em uma comunidade (DIAS, 2009).

Os cálculos dos índices Shannon, Simpson e Chao1 foram feitos pelo pacote “vegan” do software R.

### **5.9.2 Estatística**

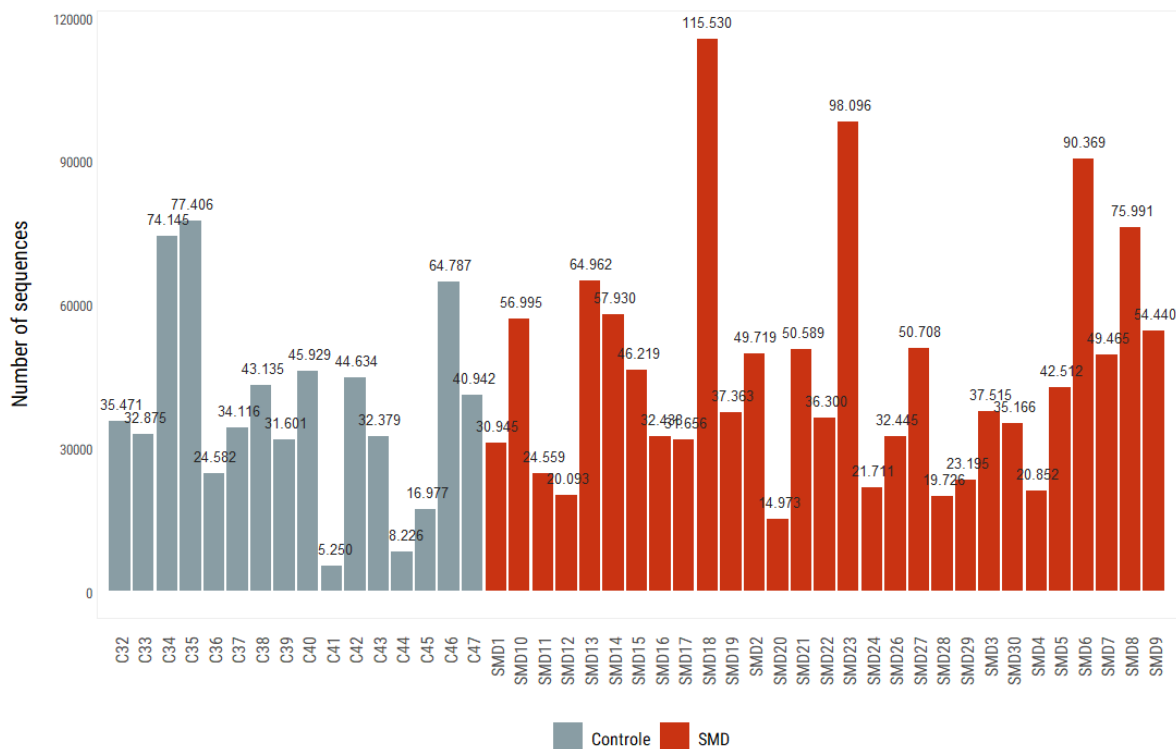
Inicialmente foi utilizada a ferramenta BIOENV (integrante do pacote vegan para R) para selecionar o subconjunto de variáveis que melhor explicam a variância dos dados biológicos, utilizando matrizes de dissimilaridade biótica e os dados de cada paciente. Este subconjunto de variáveis, definido para cada amostra, foi utilizado no teste de PERMANOVA (função adonis2 do pacote vegan), um método não paramétrico similar a análise de variância, que usa métodos de permutação para proceder testes de diferenças entre grupos, de modo a definir a significância e correlação destas com os dados bióticos (ANDERSON; GORLEY; CLARKE, 2008).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dados gerais do sequenciamento

A fim de facilitar a compreensão geral dos gráficos abaixo, deve-se levar em conta que “C” corresponde ao indivíduo controle e “SMD” corresponde ao indivíduo portador da síndrome mielodisplásica. A sigla “NA” refere-se à ausência de um determinado dado do indivíduo em questão. Os números ao lado dessas siglas referem-se à numeração da amostra do participante do estudo. É necessário frisar também que o paciente SMD25 será descrito separadamente, por ser também portador da síndrome de Bloom.

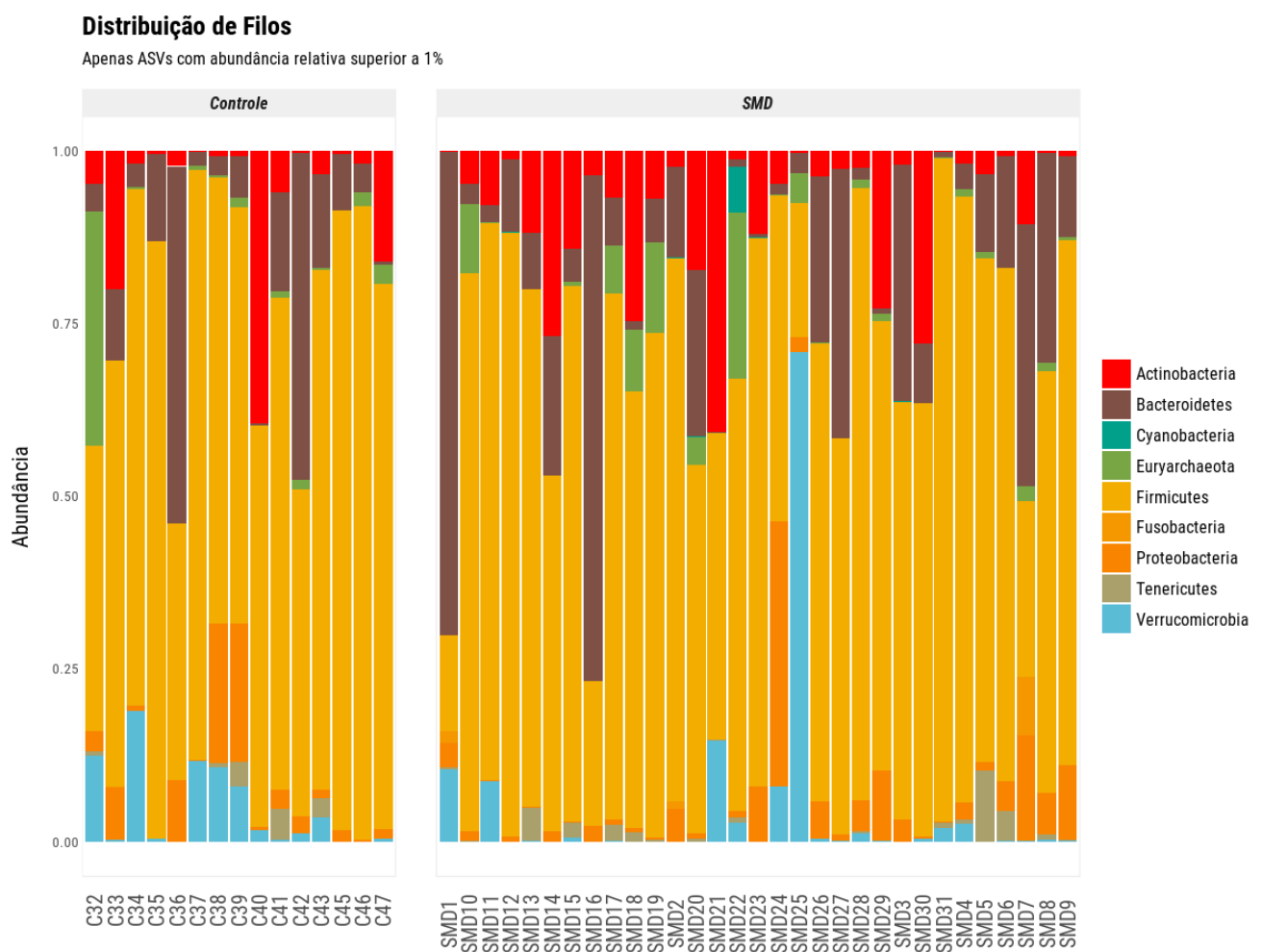
Gráfico 1 - Distribuição do número de sequências (após cortes de qualidade) por amostra fecal sequenciada.



Após a remoção de 858.003 sequências que apresentaram baixa qualidade, sequências não bacterianas e potenciais quimeras, as restantes sequências 16S rRNA totalizaram 1.934.917, com uma média de 42.998 sequências / amostra (máximo de 115.530 sequências em SMD18, mínimo de 5.250 sequências em C41, como mostra o gráfico 1) e 8.410 ASVs de Bactérias e 6 ASVs de Archaea.

Após a seleção dos filios com abundância acima de 1%, foi visto que a correlação Bacteroidetes/Firmicutes, comum em indivíduos jovens, encontra-se invertida, havendo assim o predomínio do Filo Firmicutes, seguido pelo Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, tais abundâncias são representadas no gráfico 2.

Gráfico 2 - Distribuição da abundância relativa dos filios das amostras fecais.



De modo geral, observou-se um domínio da classe Clostridia (gráfico 3) e ordem Clostridiales (gráfico 4) em ambos os grupos estudados, fato esperado, uma vez que essa classe faz parte do filo Firmicutes e este encontra-se predominante. Após filtragem dos dados de sequenciamento a nível de família e gênero, com abundâncias acima de 5% e 10% respectivamente, vale destacar o surgimento das famílias Ruminococcaceae e Lachnospiraceae com relativa abundância (gráfico 5); e os gêneros Ruminococcaceae UCG-002,

Ruminococcaceae UCG-014, *Bacteroides* sp., *Streptococcus* sp. e *Akkermansia* sp. como principais representantes (gráfico 6).

Gráfico 3 - Distribuição de classes nas amostras fecais.

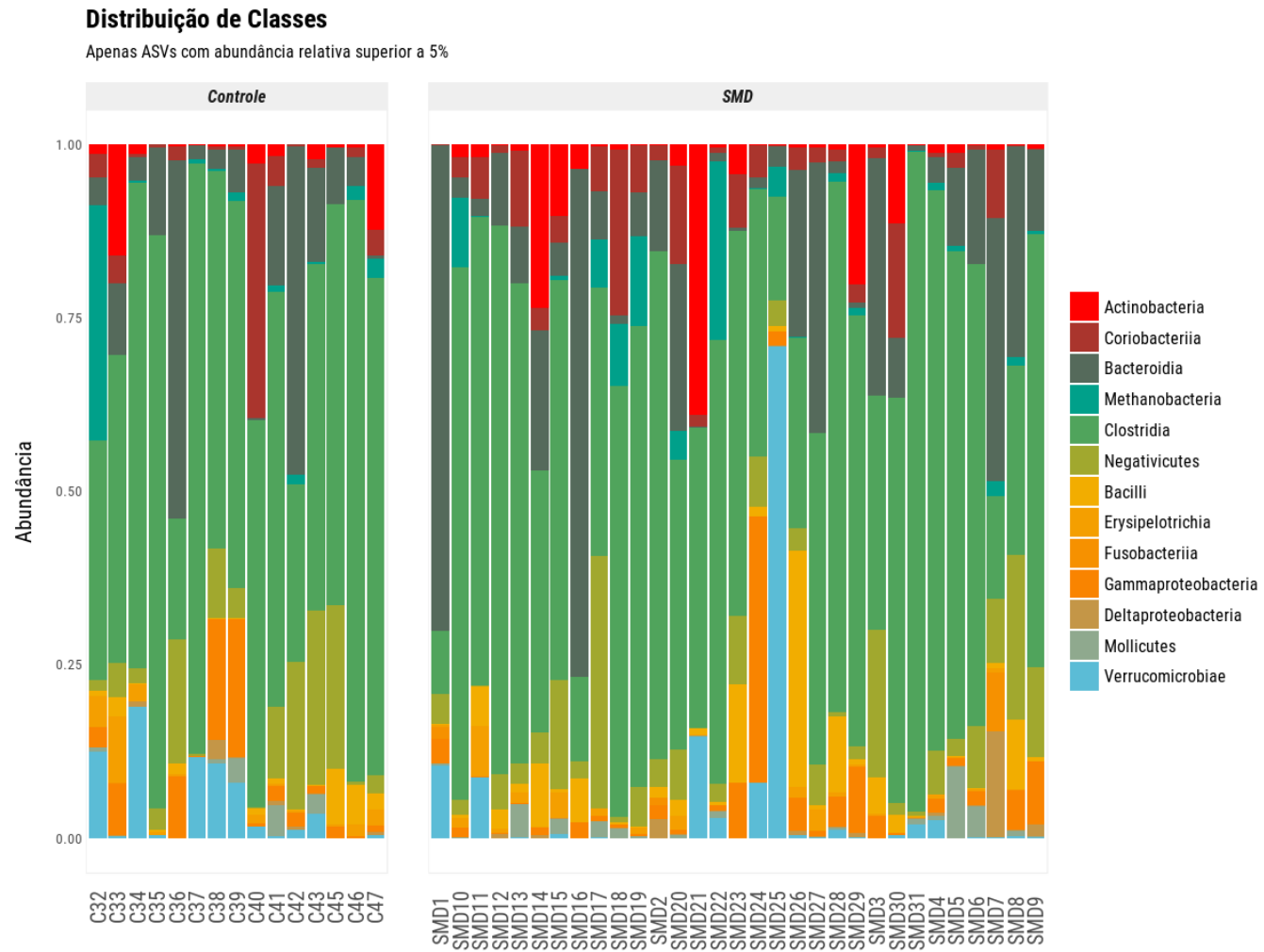




Gráfico 4 - Distribuição de ordens nas amostras fecais.

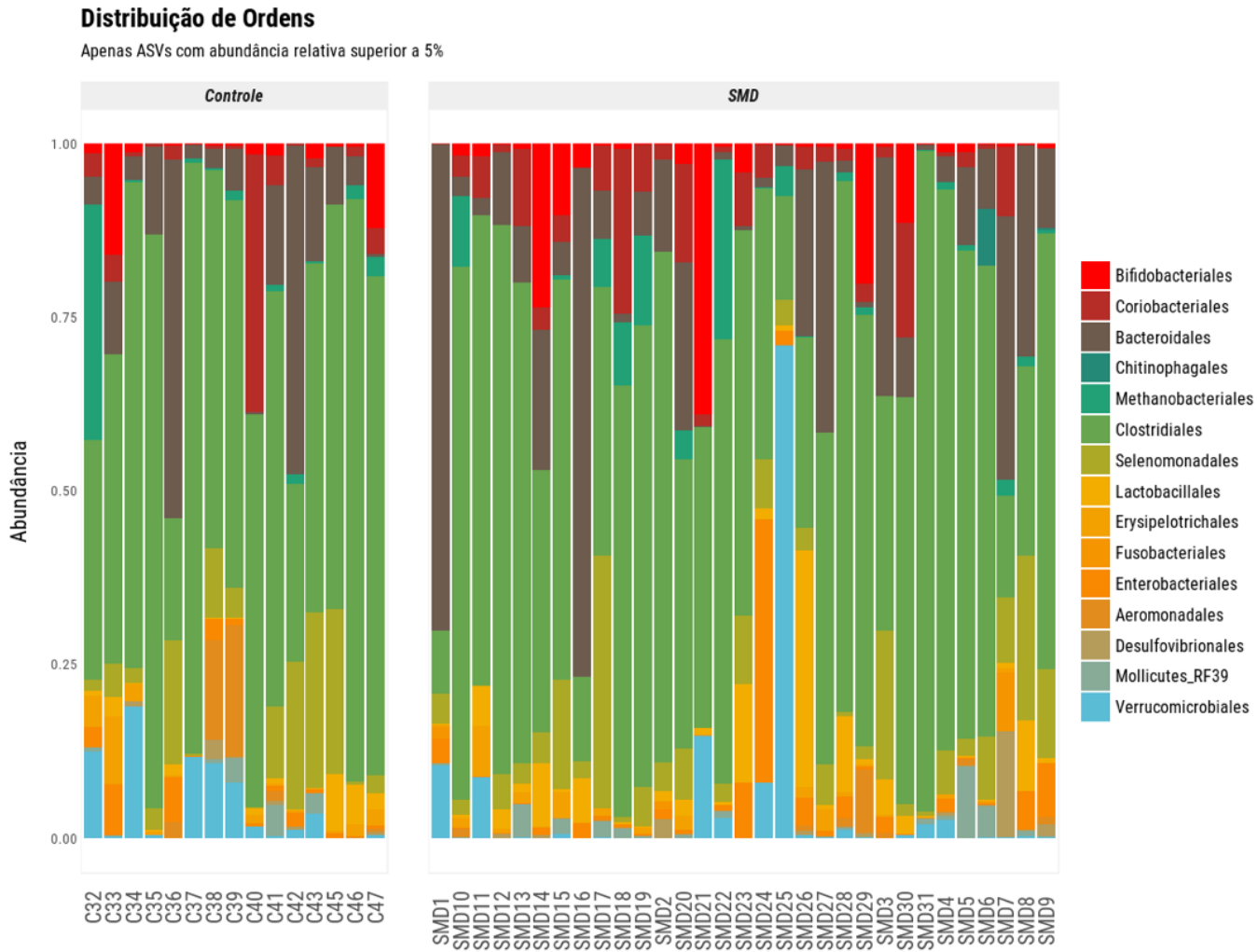


Gráfico 5 - Distribuição de famílias nas amostras fecais.

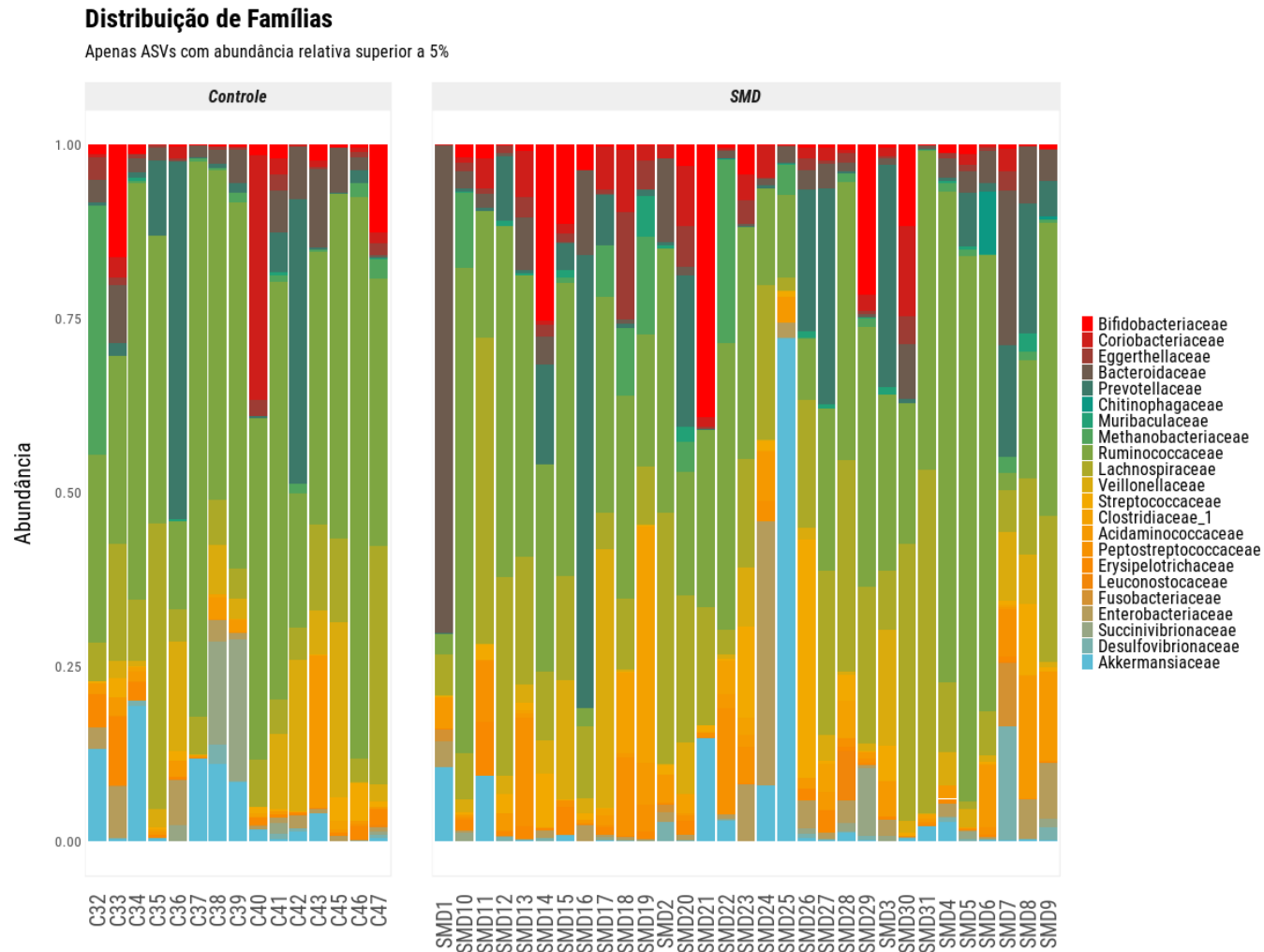
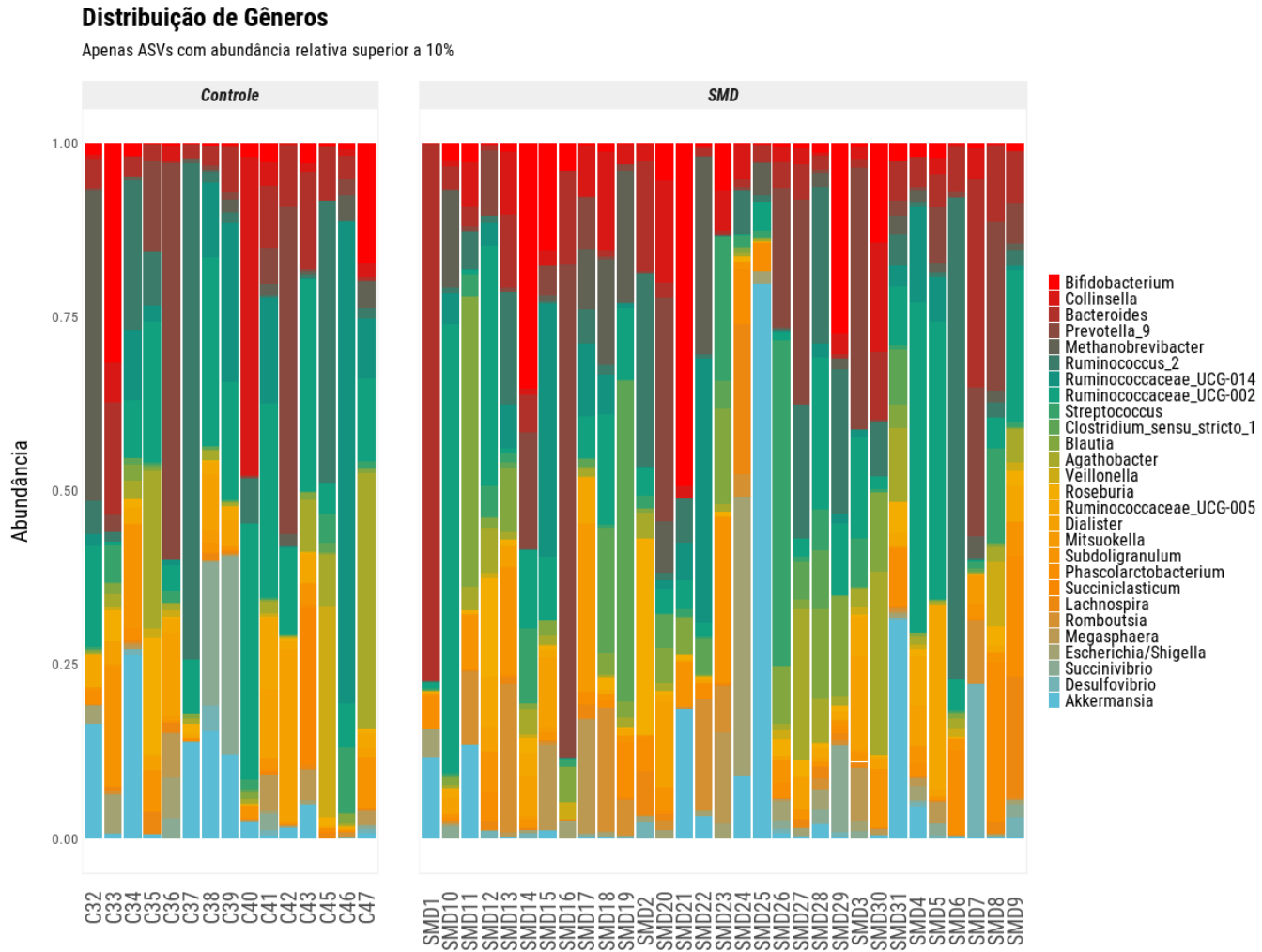


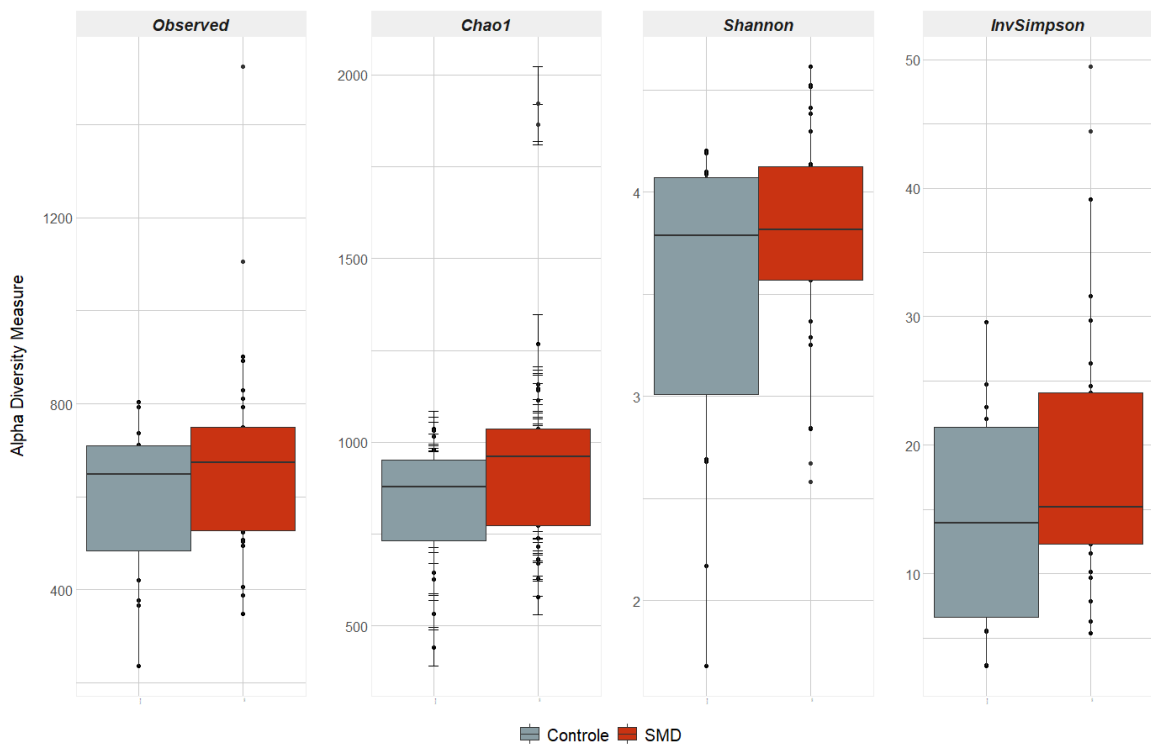
Gráfico 6 - Distribuição de gêneros nas amostras fecais.



## 6.2 Análises de diversidade e riqueza da microbiota intestinal

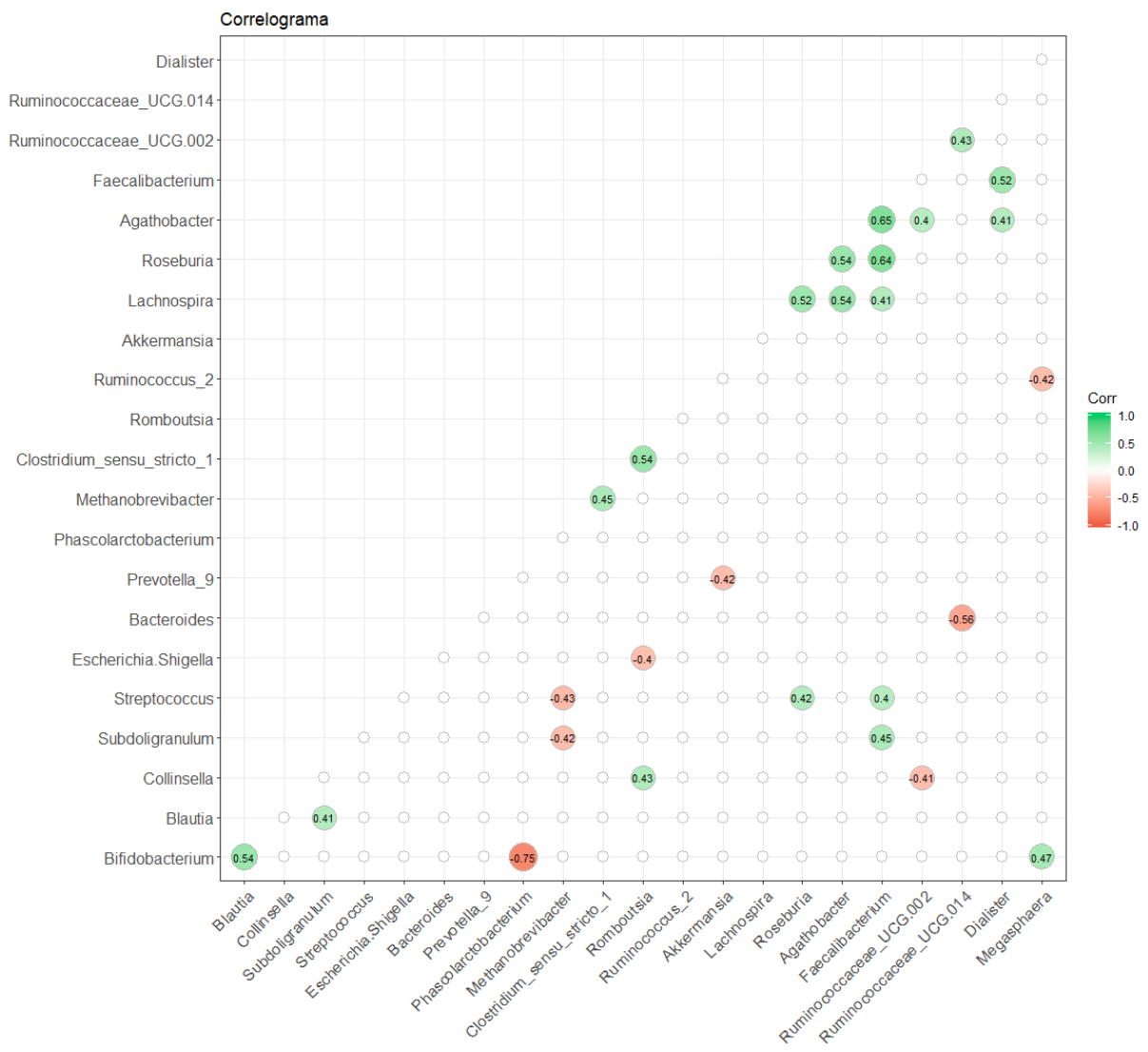
A partir das análises de  $\alpha$ -diversidade e riqueza das amostras, não foi observada diferença entre os índices de Shannon, Simpson e Chao1, comparando os valores de mediana, entre os pacientes controle e SMD. Isso indica que a  $\alpha$ -diversidade e a riqueza das amostras coletadas são equivalentes entre esses dois grupos estudados (gráfico 7).

Gráfico 7 - Diversidade e riqueza das amostras.



Dado teste de normalidade (com  $p < 0.05$ ), os dados são significativamente diferentes de uma distribuição normal. Assim, foi utilizada a correlação de Spearman, tendo o correlograma abaixo como resultado (gráfico 8).

Gráfico 8 – Correlação significativas entre os gêneros encontrados.



Dentre as correlações encontradas, pode-se destacar a correlação negativa (-0.42) entre os gêneros *Akkermansia* spp. e *Prevotella* spp.; e entre *Bacteroides* spp. e *Ruminococcus\_UCG014* (-0.56).

Após a abordagem geral dos resultados de sequenciamento, foi dado o destaque às classificações taxonômicas de filo e gênero, a fim de facilitar a visualização das possíveis correlações. Os resultados foram divididos de acordo com as variáveis de maior relevância clínica para SMD, sendo essas: subtipos de SMD (de acordo com a classificação OMS 2008),

cariótipo, hemograma, IPSS, uso de EPREX, dependência transfusional. Em relação aos dados nutricionais, estudou-se as variáveis: gordura corporal, estilismo e fumo. A variável depressão foi abordada separadamente.

### **6.3 Análise dos resultados de acordo com as variáveis clínicas da SMD**

#### **6.3.1 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com os subtipos de SMD**

Dividiu-se os subtipos de pacientes segundo seu risco de progressão para LMA, para facilitar a formação de grupos. Assim, os pacientes ficaram divididos em de baixo risco (subtipos AR, ARSA), risco intermediário (subtipo CRDM) e alto risco (subtipos AREB I e AREB II).

Observou-se que, em relação aos filos encontrados de acordo com o subtipo de SMD (gráfico 9), houve aumento do filo Actinobateria em pacientes SMD de alto risco quando comparados aos controles ( $p=0.063$ ) (gráfico 10). Em relação à distribuição de gêneros de acordo com os subtipos de SMD, como mostrado no gráfico 11, foi visto uma diminuição significativa do gênero *Ruminococcus* spp. em pacientes SMD-AREB em relação aos controles ( $p=0.045$ ) (gráfico 12). Enquanto que, comparando apenas os pacientes SMD entre si, foi encontrado aumento da abundância do gênero *Streptococcus* spp. ( $p=0.06$ ) nos SMD de alto risco (gráfico 13).

Gráfico 9 – Distribuição de filios de acordo com os subtipos de SMD.

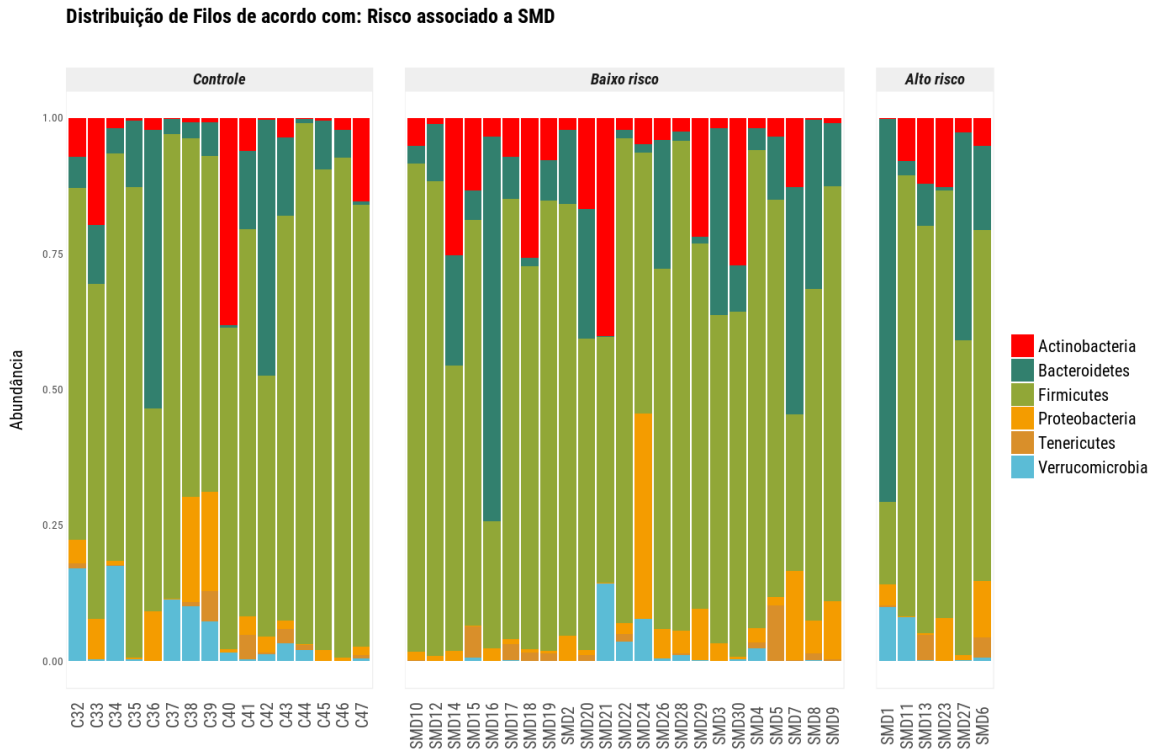


Gráfico 10 – Distribuição do filo Actinobacteria de acordo com os subtipos de SMD.

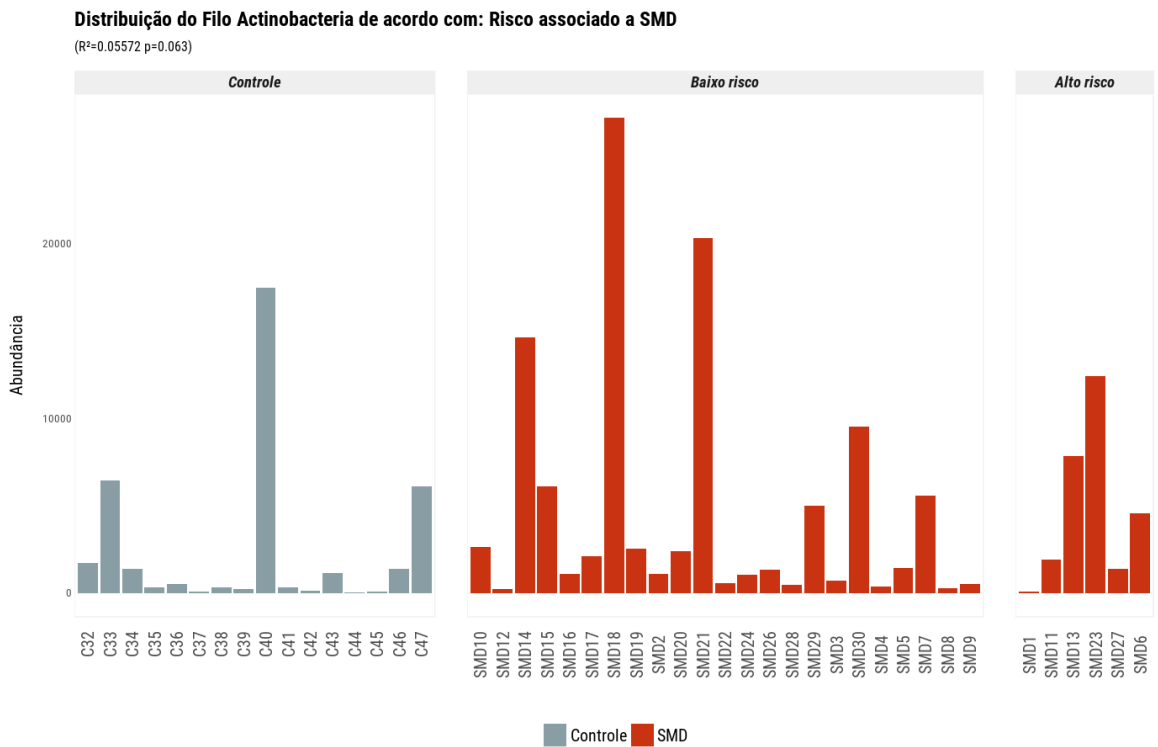


Gráfico 11 – Distribuição de gêneros de acordo com os subtipos de SMD.

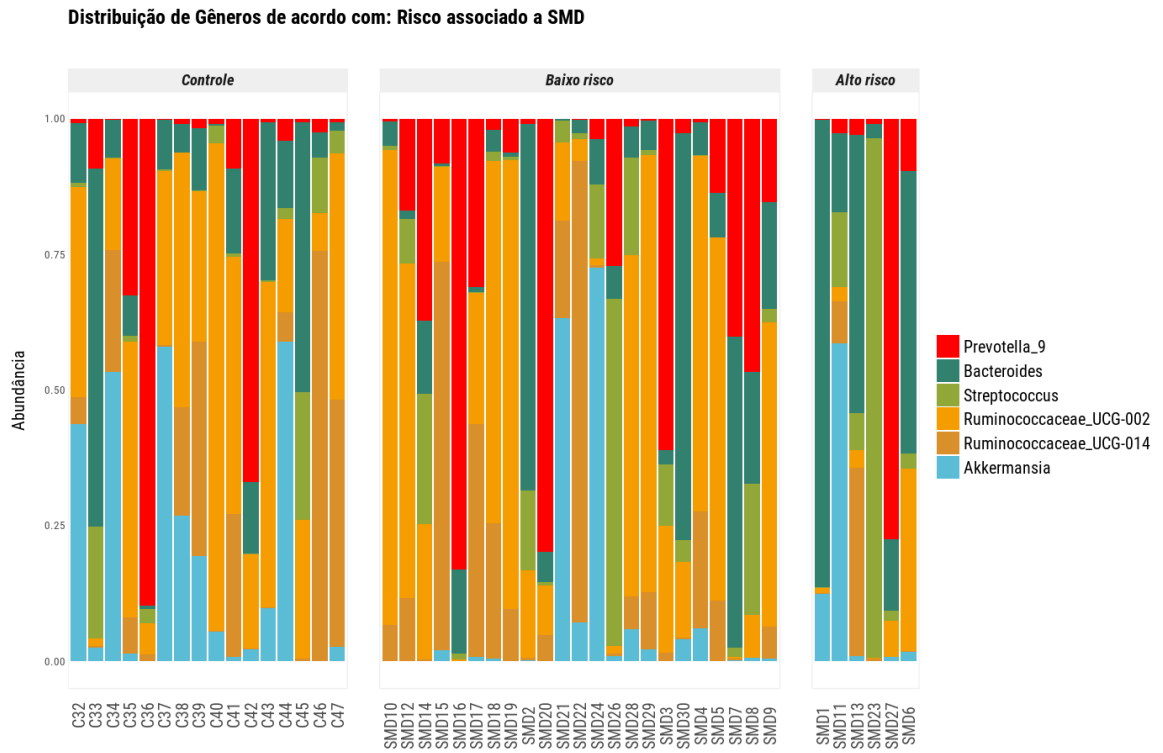




Gráfico 12 – Distribuição do gênero *Ruminococcus* spp. de acordo com os subtipos de SMD.

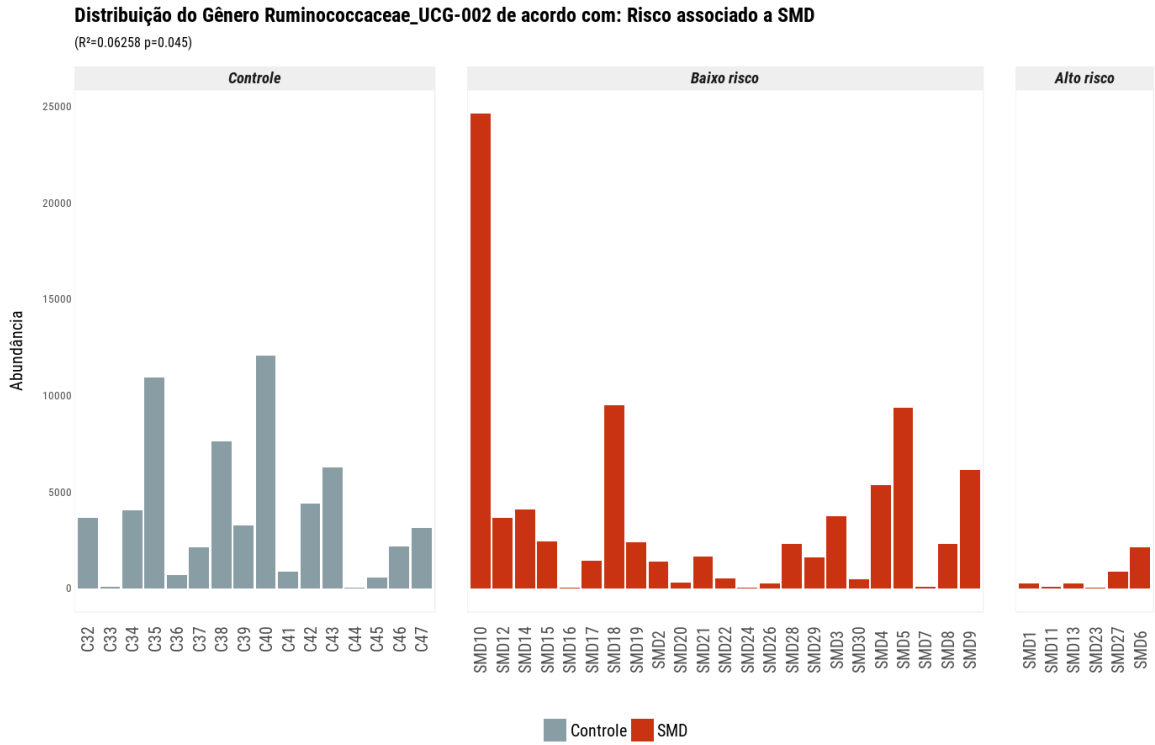
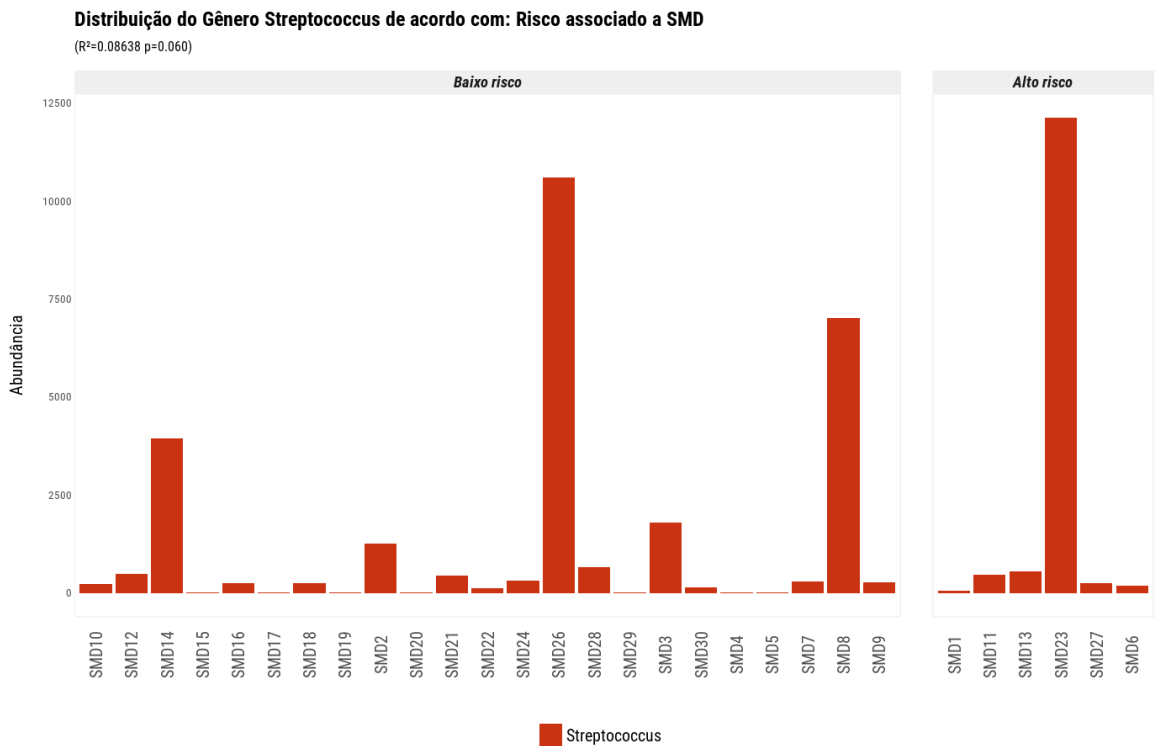


Gráfico 13 – Distribuição do gênero *Streptococcus* spp. de acordo com os subtipos de SMD.



### 6.3.2 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o Cariótipo

Dois grupos foram formados entre os pacientes com SMD, os que apresentaram cariótipo alterado e os de cariótipo normal. Não foi observada diferença significativa entre as abundâncias dos filos e gêneros em tais grupos (gráficos 14 e 15). Vale destacar que os controles não foram avaliados em relação ao cariótipo. No entanto, foram incluídos nos gráficos, para ressaltar a equivalência entre os perfis de filos e gêneros encontrados nesse grupo de pacientes e os pacientes SMD que não apresentaram alteração de cariótipo.

Gráfico 14 - Distribuição de filos de acordo com os resultados de cariótipo dos pacientes com SMD.

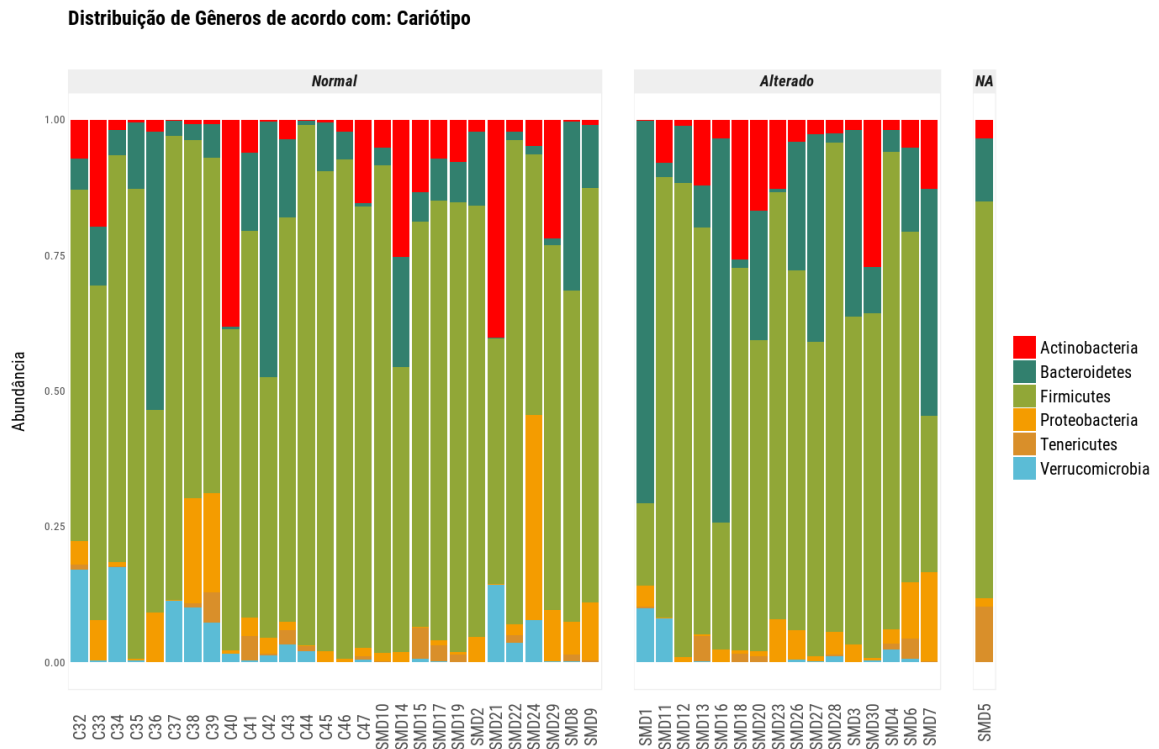
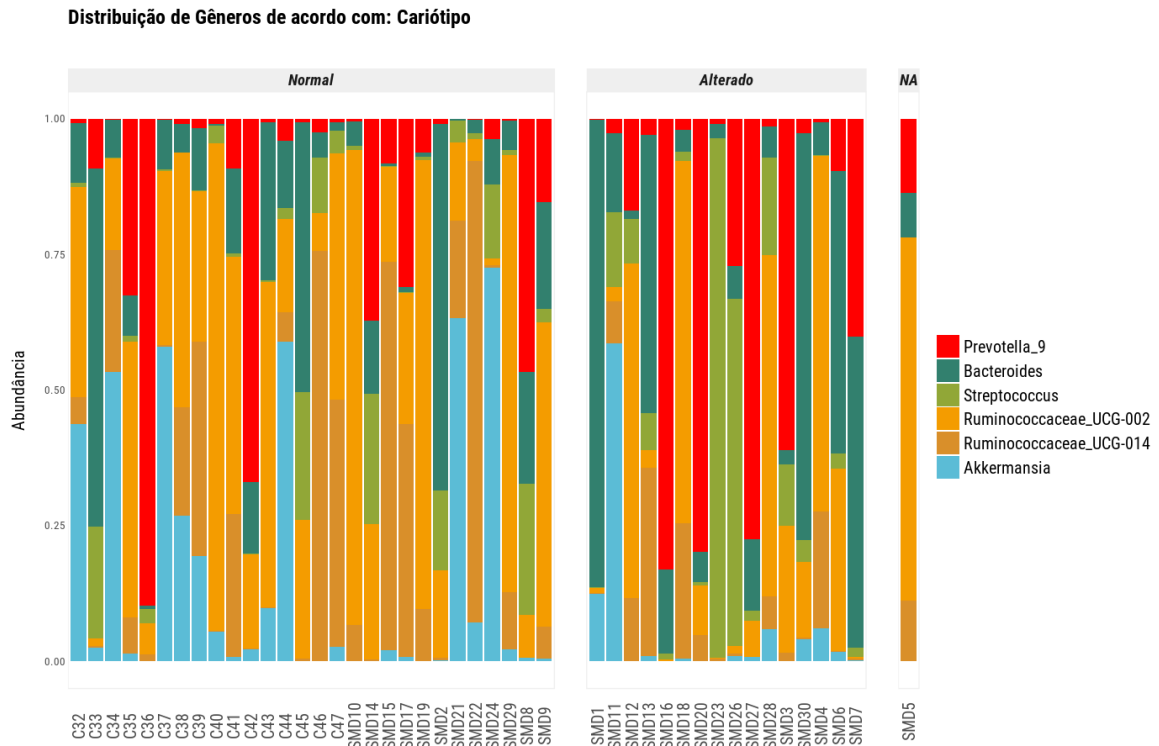


Gráfico 15 - Distribuição de gênero de acordo com os resultados de cariótipo dos pacientes com SMD.



### 6.3.1 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o Hemograma

Foi realizada análise estatística buscando uma correlação entre os componentes dos hemogramas de relevância clínica (hemoglobina, neutrófilos e plaquetas) e os componentes da microbiota. Para tanto, os pacientes com SMD foram agrupados, de acordo com os níveis de hemoglobina (Hb < 8, 8-10 e > 10 g/dL), neutrófilos (< 1000, 1000 - 4000 e > 4000 / $\mu$ L) e plaquetas (< 50000, 50000 - 100000 e > 100000 / $\mu$ L).

#### 6.3.1.1 Hemoglobina

Após análises das abundâncias relativas dos gêneros bacterianos em pacientes, notou-se que os pacientes com níveis < 8 g/dL de Hemoglobina apresentaram redução do filo Verrucomicrobia ( $p=0.007$ ) (gráfico 16). E, conseqüentemente, observou-se também redução ( $p=0.014$ ) do gênero *Akkermansia* spp. nesse mesmo grupo de pacientes em relação aos outros dois grupos (gráfico 17).

Gráfico 16 - Distribuição do filo Verrucomicrobia de acordo com os níveis de hemoglobina.

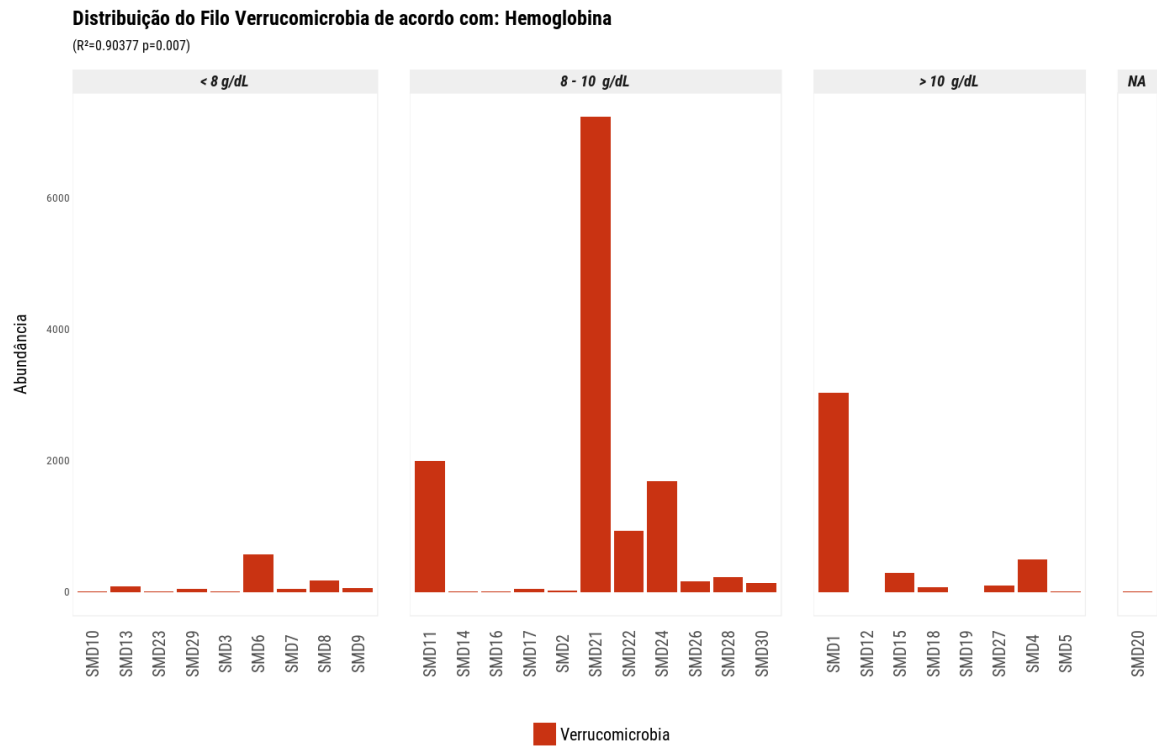
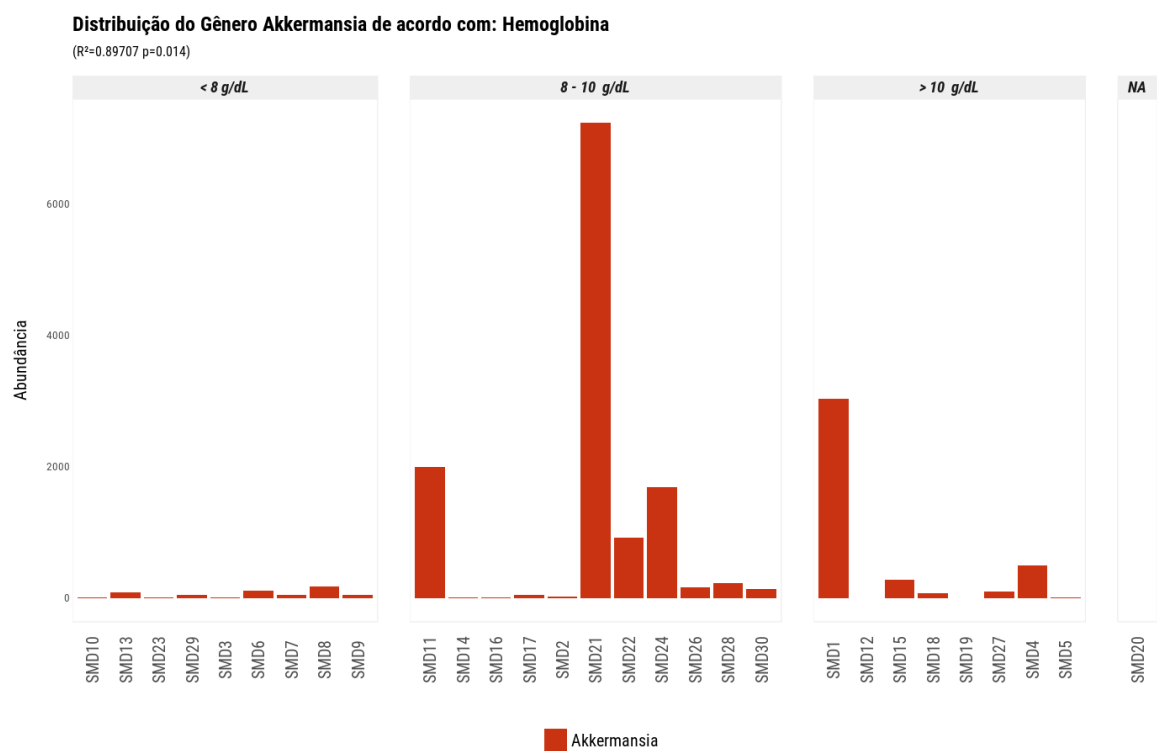


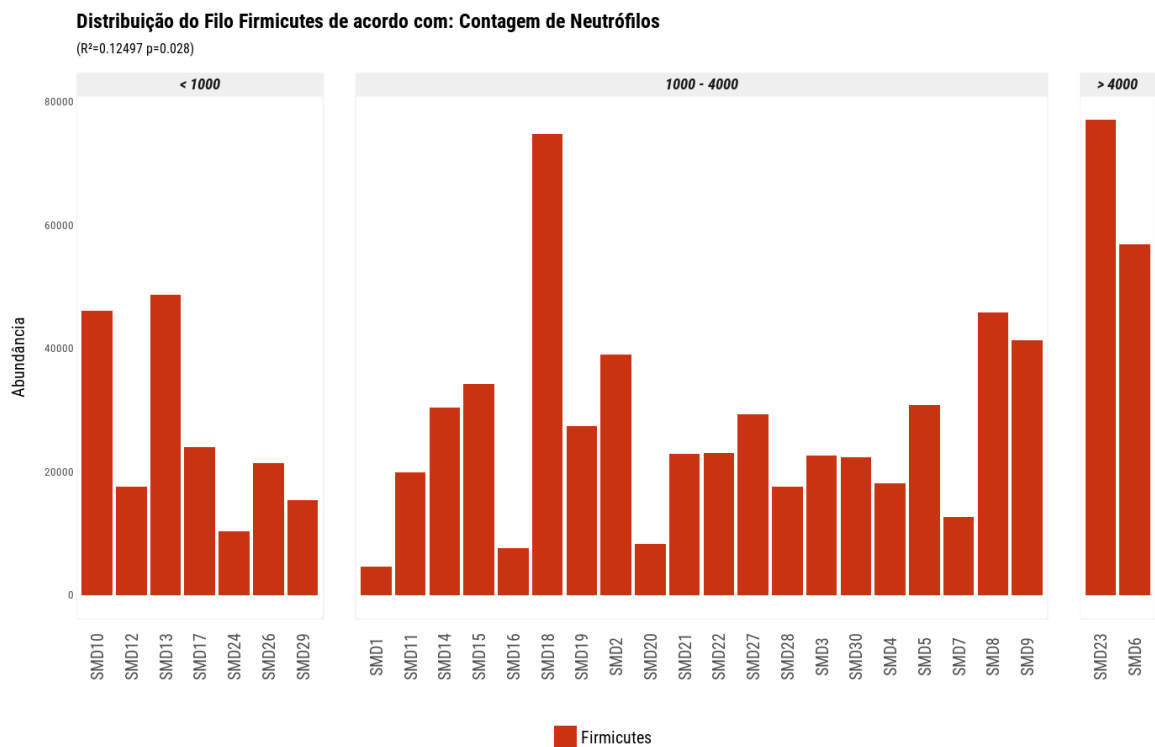
Gráfico 17 - Distribuição do gênero Akkermansia spp. de acordo com os níveis de hemoglobina.



### 6.3.1.2 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com os Neutrófilos

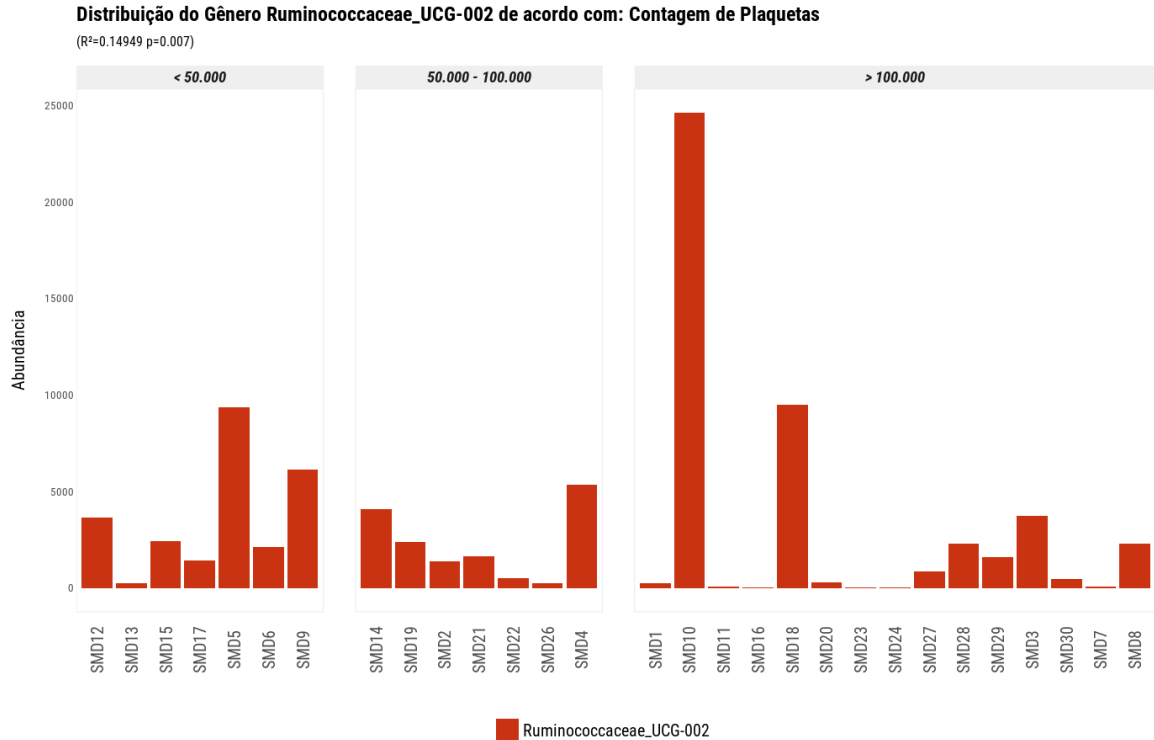
Encontrou-se redução significativa ( $p=0.028$ ) da abundância relativa do filo Firmicutes nos pacientes que apresentavam níveis baixos de neutrófilos  $< 1000 /\mu\text{L}$  (gráfico 18).

Gráfico 18 - Distribuição do filo Firmicutes de acordo com os níveis de neutrófilos.



### 6.3.1.3 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o número de Plaquetas

Foi observado aumento ( $p=0.007$ ) significativo do gênero *Ruminococcus\_UCG-002* nos pacientes que apresentavam níveis de plaquetas  $< 50000 /\mu\text{L}$  (gráfico 19).

Gráfico 19 - Distribuição do gênero *Ruminococcus*\_UCG-002 de acordo com os níveis de plaquetas.

### 6.3.2 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o IPSS

Dada a importância do IPSS para a avaliação prognóstica do paciente, esta variável foi avaliada em relação aos perfis de microbiota encontrados. Para tanto, dividiu-se os pacientes entre baixo, intermediário e alto risco (gráfico 20).

Estatisticamente, não foi encontrada diferença significativa entre a abundância dos filos nos grupos analisados (gráfico 20).

Em relação aos gêneros encontrados (gráfico 21), analisando separadamente a abundância do gênero *Akkermansia* spp., observou-se que a abundância desse gênero foi diretamente proporcional à gravidade do IPSS e que este gênero estava mais representado no grupo controle (indivíduos saudáveis), ou seja, o grupo de pacientes de alto risco apresentaram os menores níveis de abundância do gênero *Akkermansia* sp. ( $p=0,009$ ) (gráfico 22). Comparando apenas os pacientes entre si, tendo como variável os riscos segundo o IPSS, também se viu redução dos níveis de abundância do gênero *Akkermansia* sp. ( $p=0,035$ ) nos pacientes de maior

risco (gráfico 23), quando comparados aos pacientes de menor risco. Enquanto que, para o gênero *Prevotella* spp. observou-se aumento ( $p=0.029$ ) significativo nos pacientes IPSS alto risco (gráfico 24), em relação às demais categorias de risco.

Gráfico 20 - Distribuição de filões de acordo com escore prognóstico IPSS.

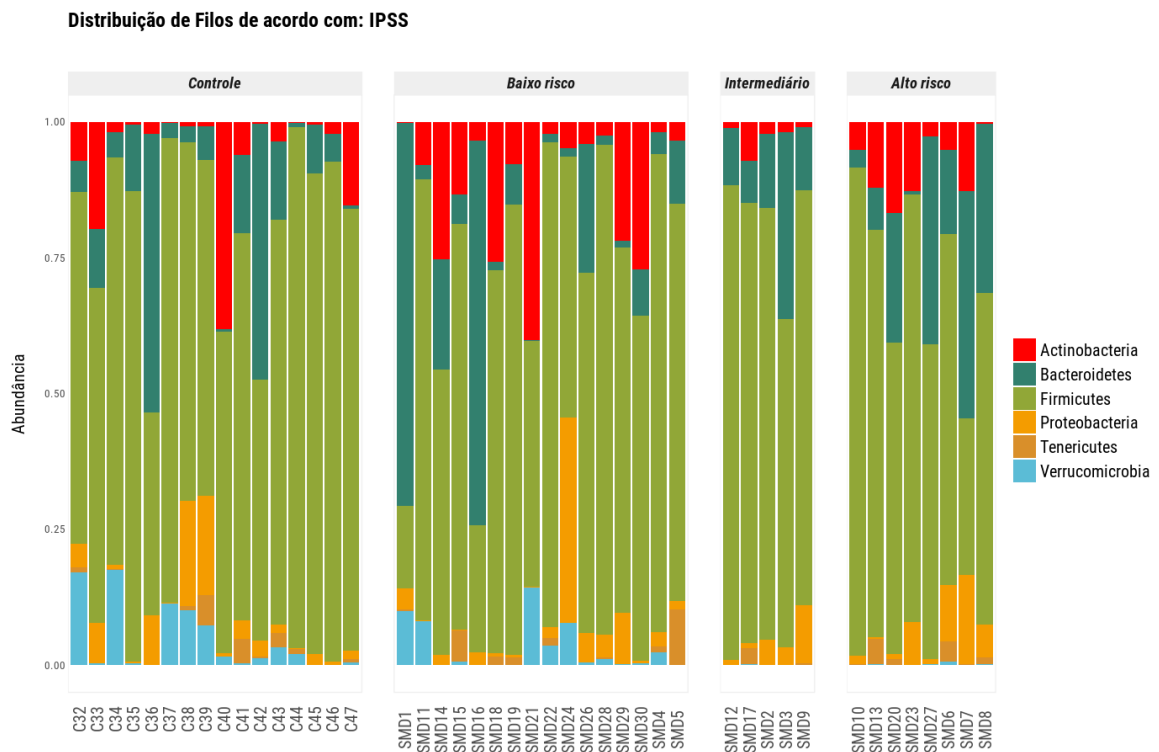


Gráfico 21 - Distribuição de gêneros de acordo com escore prognóstico IPSS.

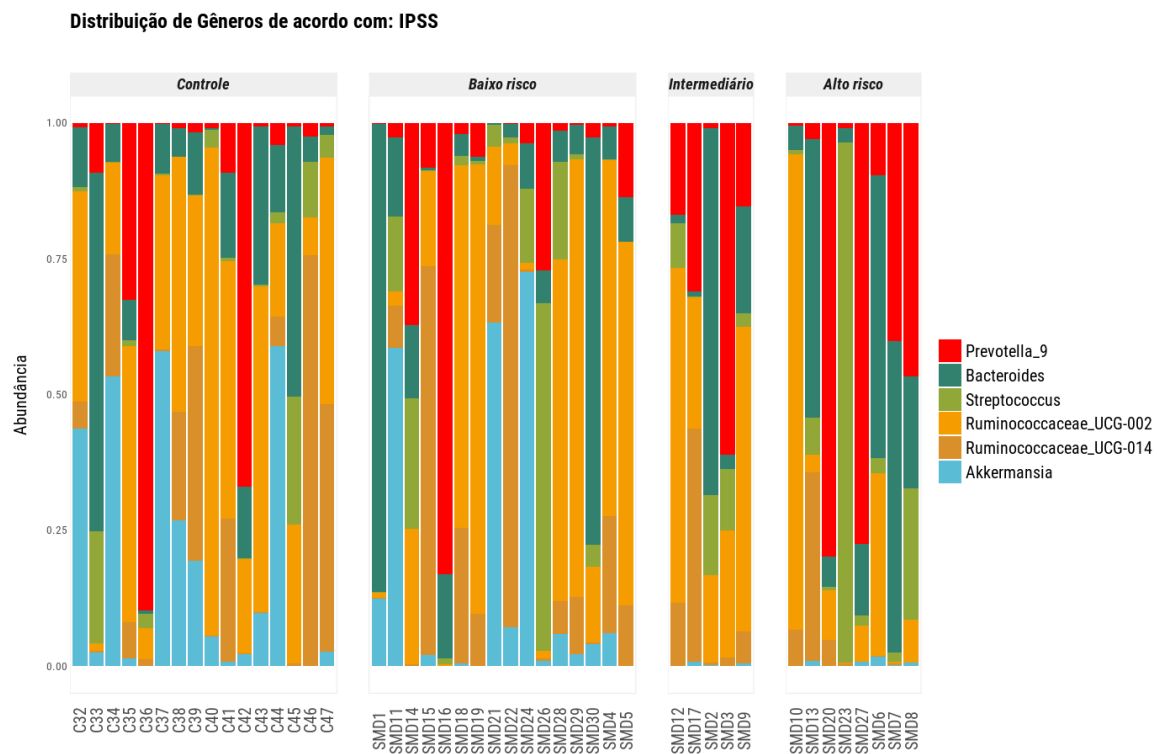




Gráfico 22 - - Distribuição do gênero *Akkermansia* spp. de acordo com escore prognóstico IPSS e pacientes controle.

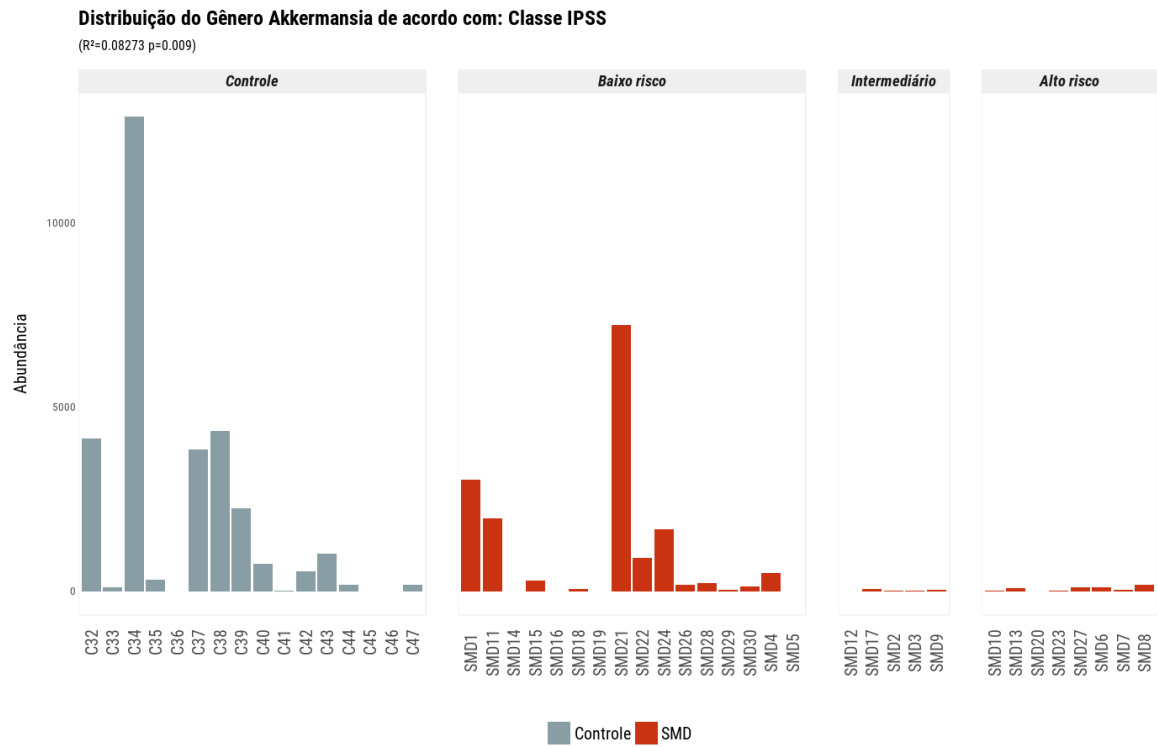


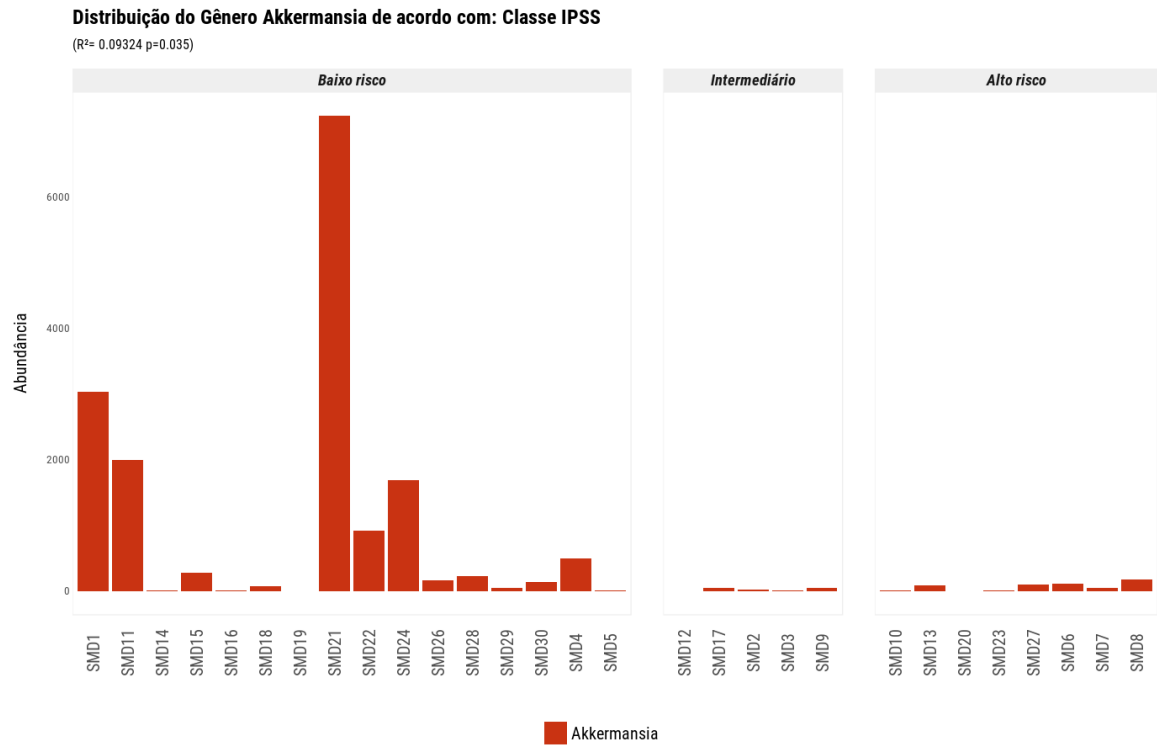
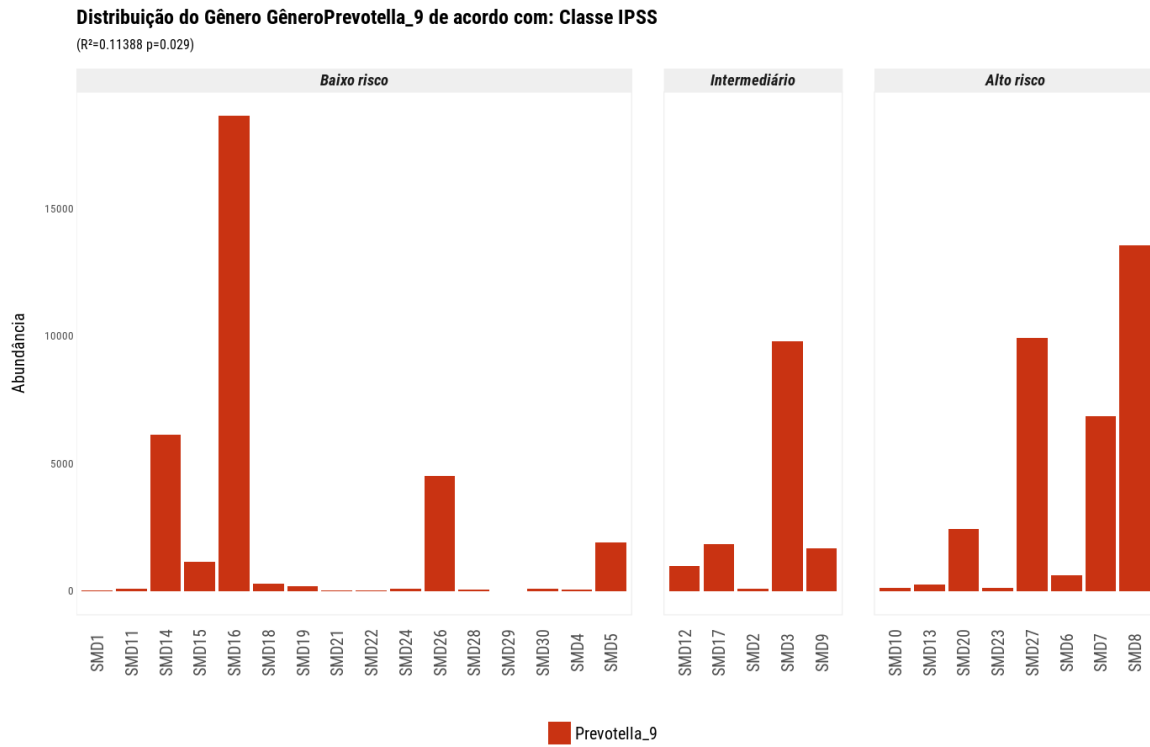
Gráfico 23 - - Distribuição do gênero *Akkermansia* spp. de acordo com escore prognóstico IPSS.

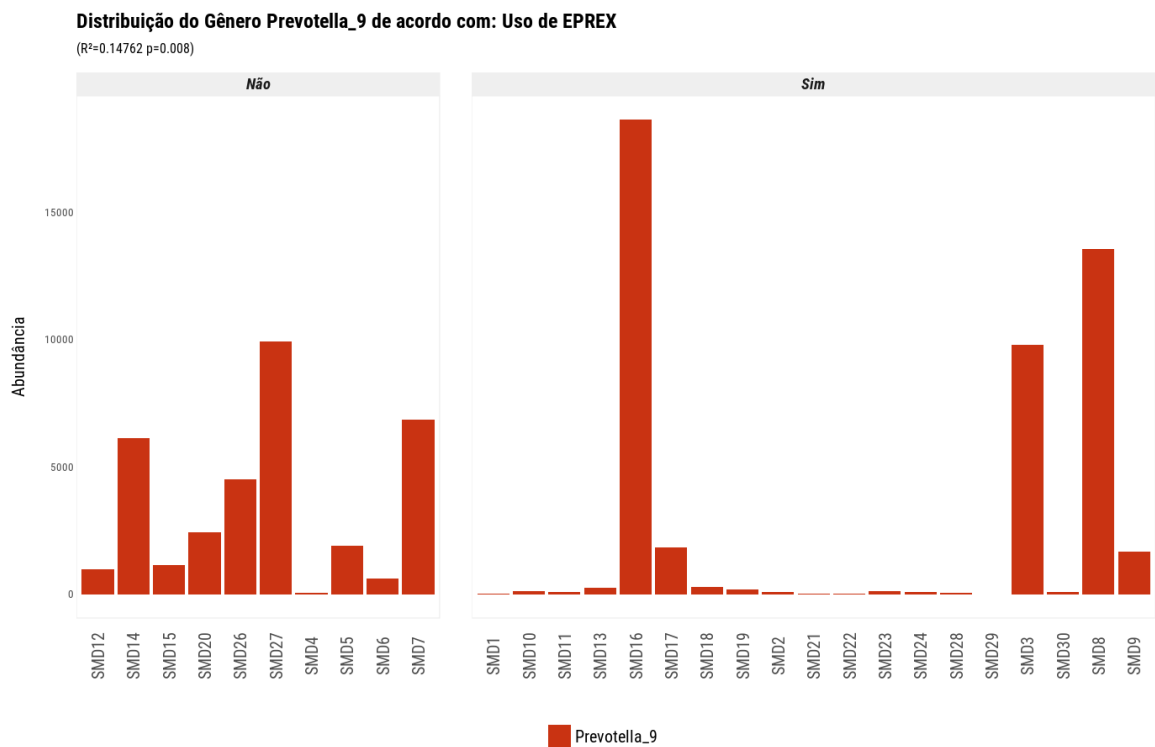
Gráfico 24 - Distribuição do gênero *Prevotella* spp. de acordo com escore prognóstico IPSS.

### 6.3.3 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com o uso de EPREX

A fim de analisar a influência do uso de EPREX na composição da microbiota intestinal, dividiu-se os pacientes com SMD em dois grupos, os que foram e os que não foram submetidos ao tratamento com EPREX. No entanto, não foi encontrada diferença significativa entre a abundância dos filos.

Em relação aos gêneros, foi constatada uma redução significativa ( $p=0.008$ ) do gênero *Prevotella* spp. no grupo de pacientes que foram submetidos ao tratamento com EPREX (gráfico 25).

Gráfico 25 - Distribuição do gênero *Prevotella* spp. de acordo com o uso de EPREX.



### 6.3.4 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com a Dependência transfusional

A necessidade de transfusão sanguínea como tratamento também foi avaliada como variável em relação à composição da microbiota (gráficos 26 e 27). Porém, não foi verificada diferença significativa dos filos e dos gêneros de microbiota entre os dois grupos de pacientes. Os pacientes controles foram incluídos nos gráficos, para ressaltar a equivalência entre os perfis de filos e gêneros encontrados nesse grupo de pacientes e os pacientes SMD que não dependem de transfusão sanguínea.

Gráfico 26 - Distribuição dos filos de acordo com a dependência transfusional dos pacientes.

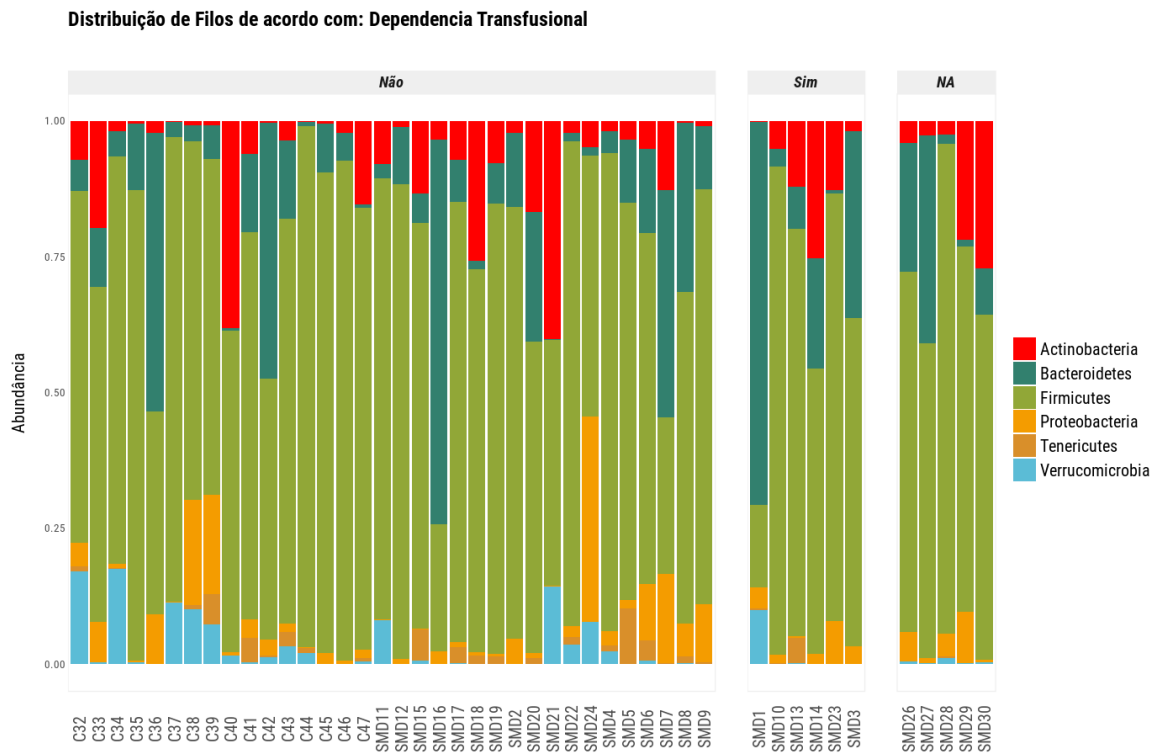
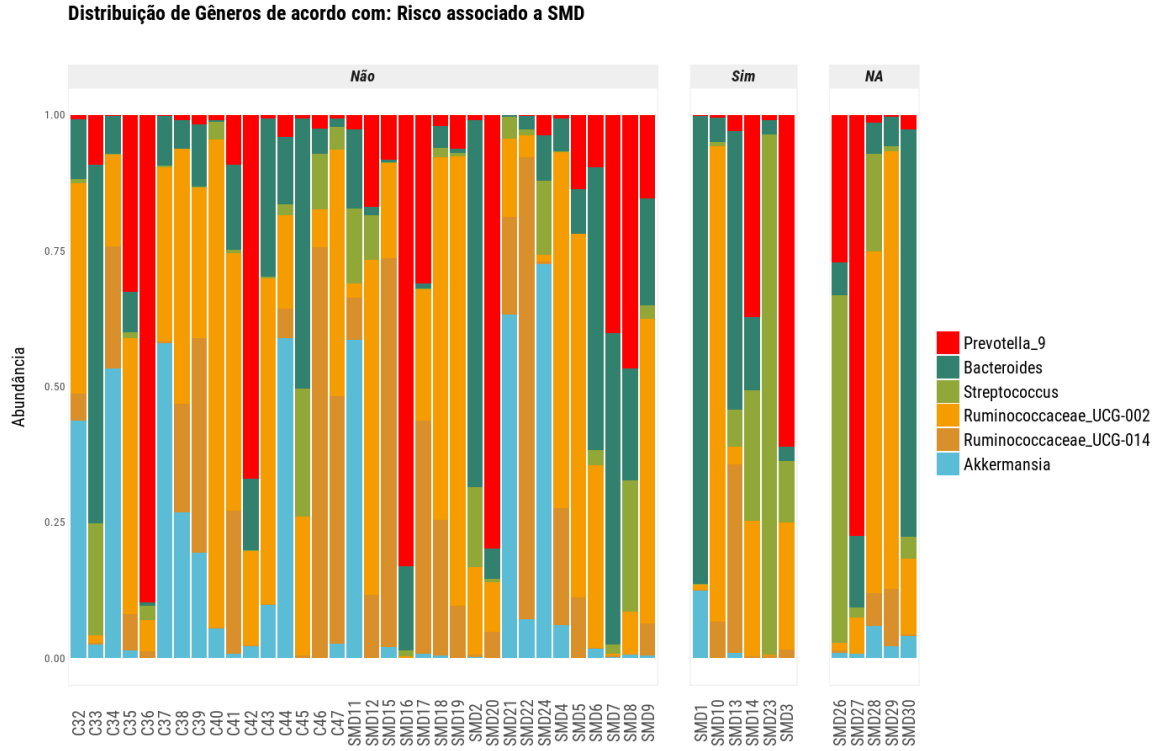


Gráfico 27 - Distribuição dos gêneros de acordo com a dependência transfusional dos pacientes.



## 6.4 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com as variáveis nutricionais

### 6.4.1 Gordura corporal

As diferenças entre os filos (gráfico 28) e os gêneros (gráfico 29), correlacionando com os perfis encontrados com o percentual de gordura (adequado: < 25% e elevado: > 25%) dos pacientes com SMD, foram estudadas, porém não houve diferença significativa da abundância.

Gráfico 28 - Distribuição dos filos de acordo com a gordura corporal dos pacientes.

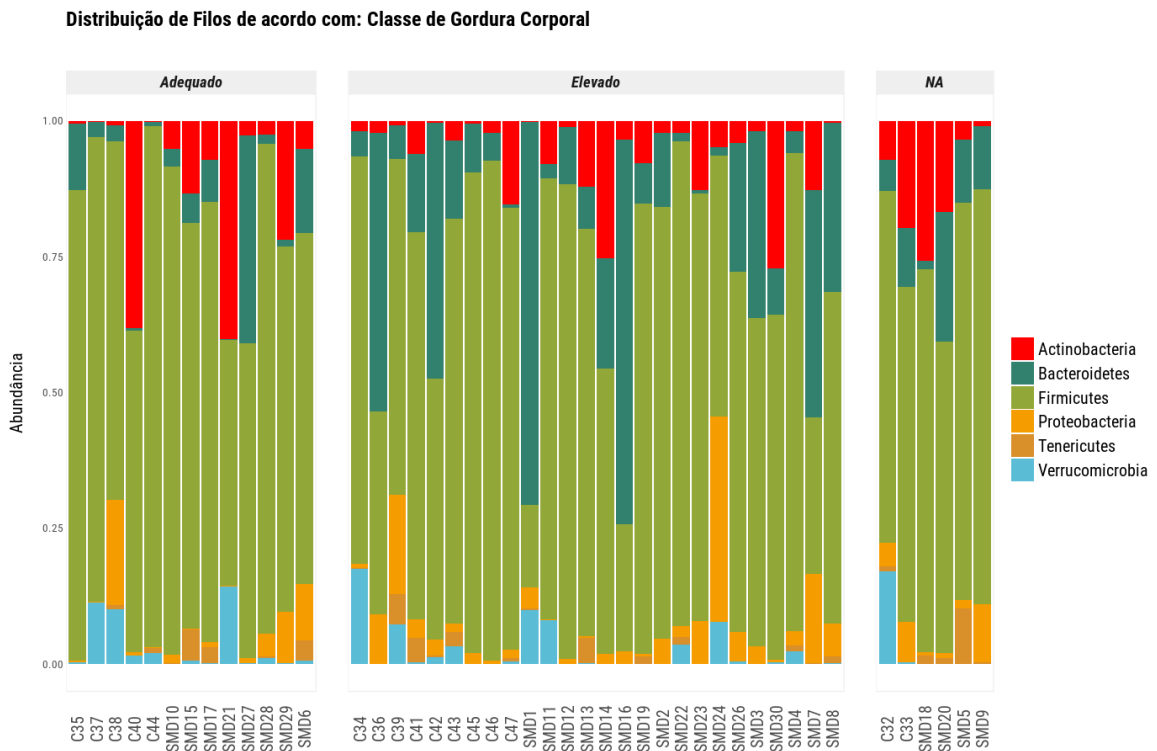
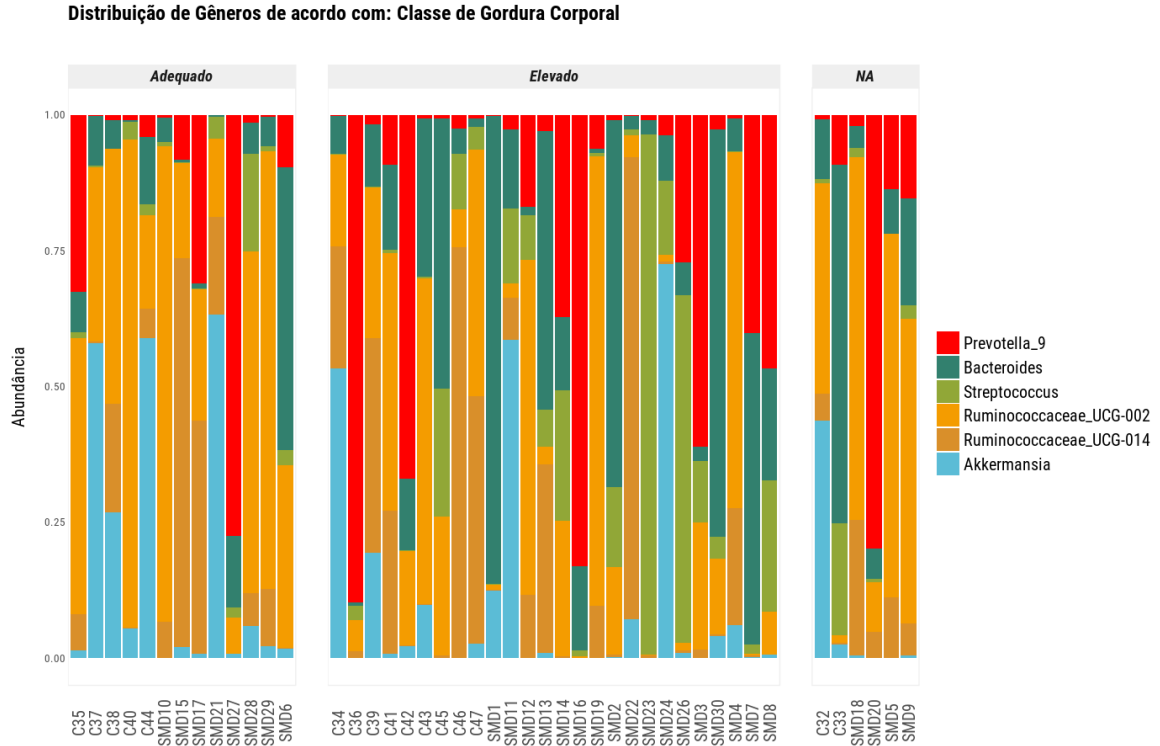


Gráfico 29 - Distribuição dos gêneros de acordo com a gordura corporal dos pacientes.



Adicionalmente, foram analisadas as variáveis fumo e etilismo (gráfico 30), no entanto, não se observou diferença significativa das abundâncias nos pacientes que tem o fumo como hábito. Porém, foi observada redução ( $p=0.010$ ) significativa do filo Tenericutes nos pacientes etilistas (gráfico 31).



Gráfico 30 - Distribuição de filos em relação aos pacientes fumantes e etilistas.

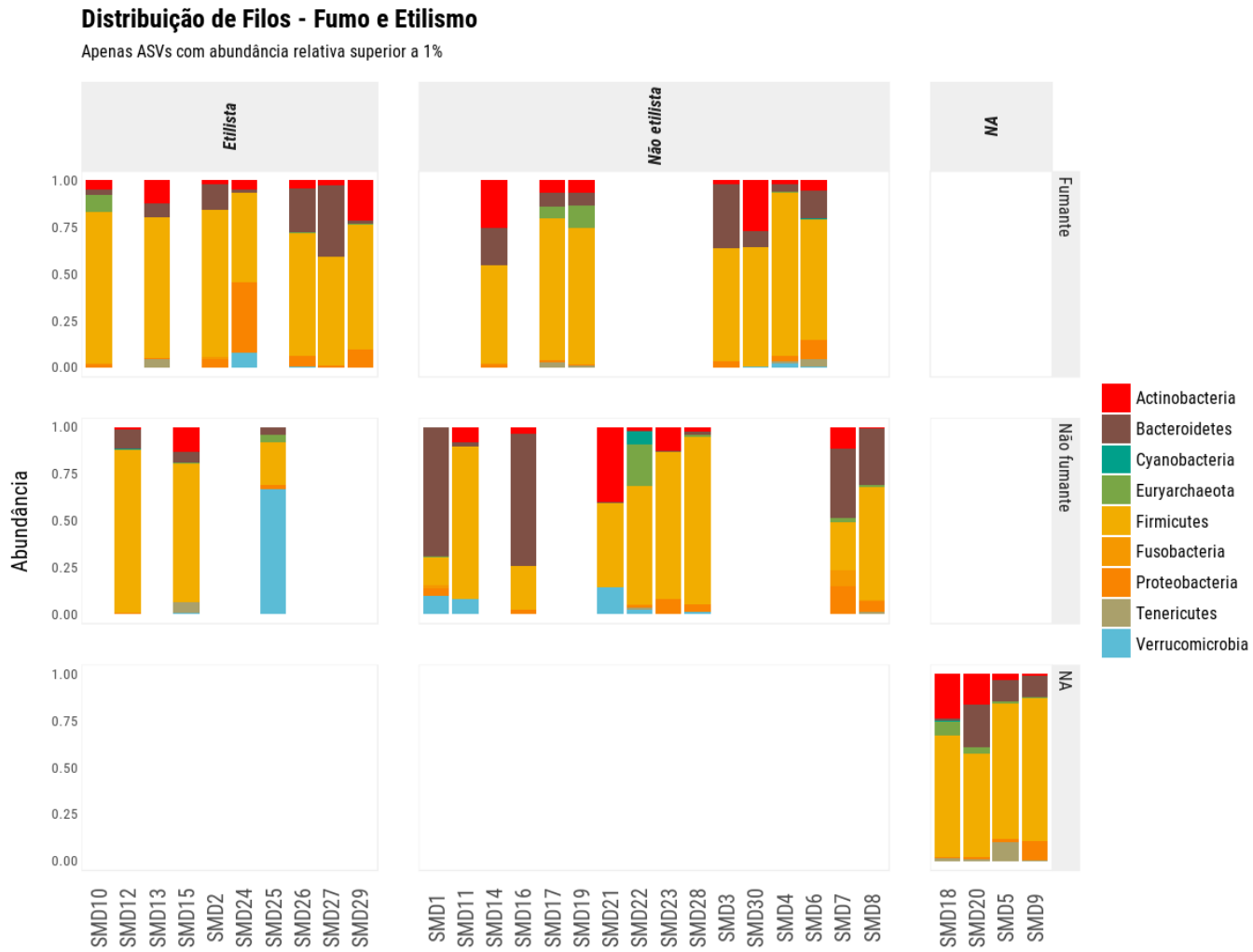
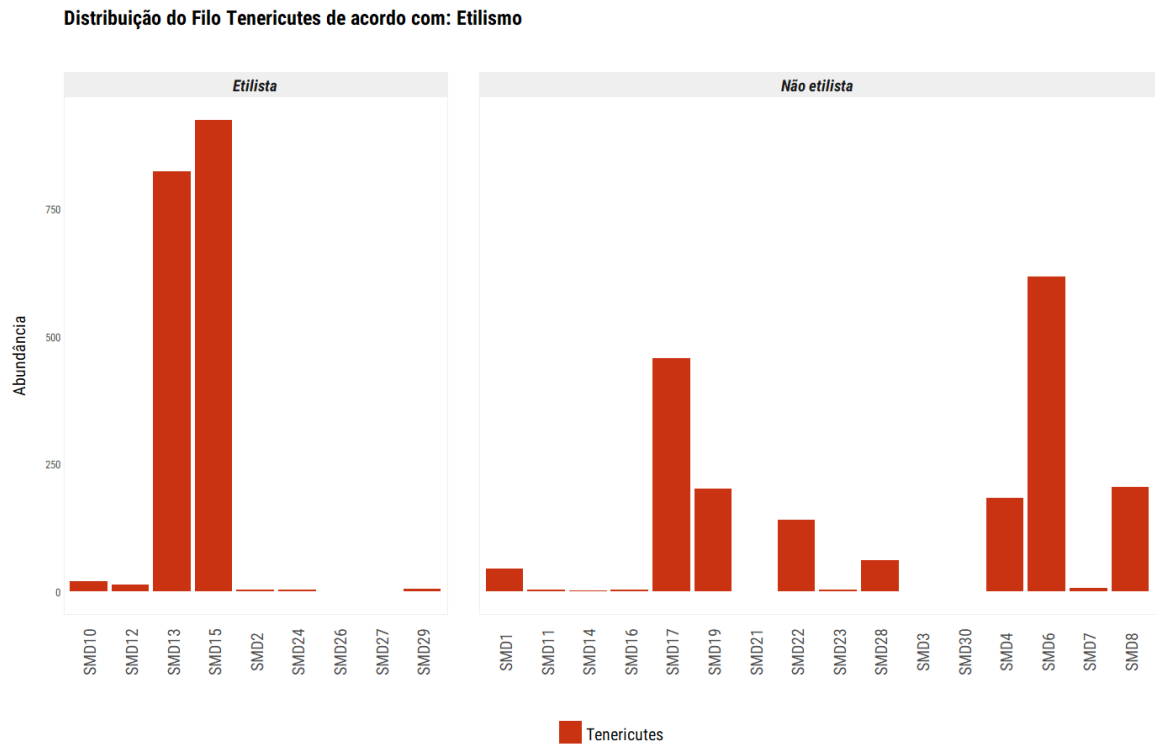


Gráfico 31 - Distribuição do filo Tenericutes de acordo com o consumo de álcool.



### 6.4.1 Análise de alterações na microbiota intestinas de acordo com a manifestação ou não de depressão

Com intuito de avaliar uma possível correspondência entre a presença de sintomas de depressão e as alterações nos perfis de microbiota intestinal, os indivíduos participantes do estudo foram divididos em dois grupos: deprimidos (grupo “sim”, > 10 no inventário BECK) e não deprimidos (grupo “não”, < 10 no inventário BECK). Não houve diferença significativa na abundância dos filos entre os dois grupos (gráfico 32). Vale destacar que nesta análise foram incluídos pacientes com depressão de leve a grave, não sendo realizada, portanto, avaliação de acordo com a gravidade da depressão.

Gráfico 32 - Distribuição dos filos em relação aos grupos de pacientes não deprimidos e deprimidos.

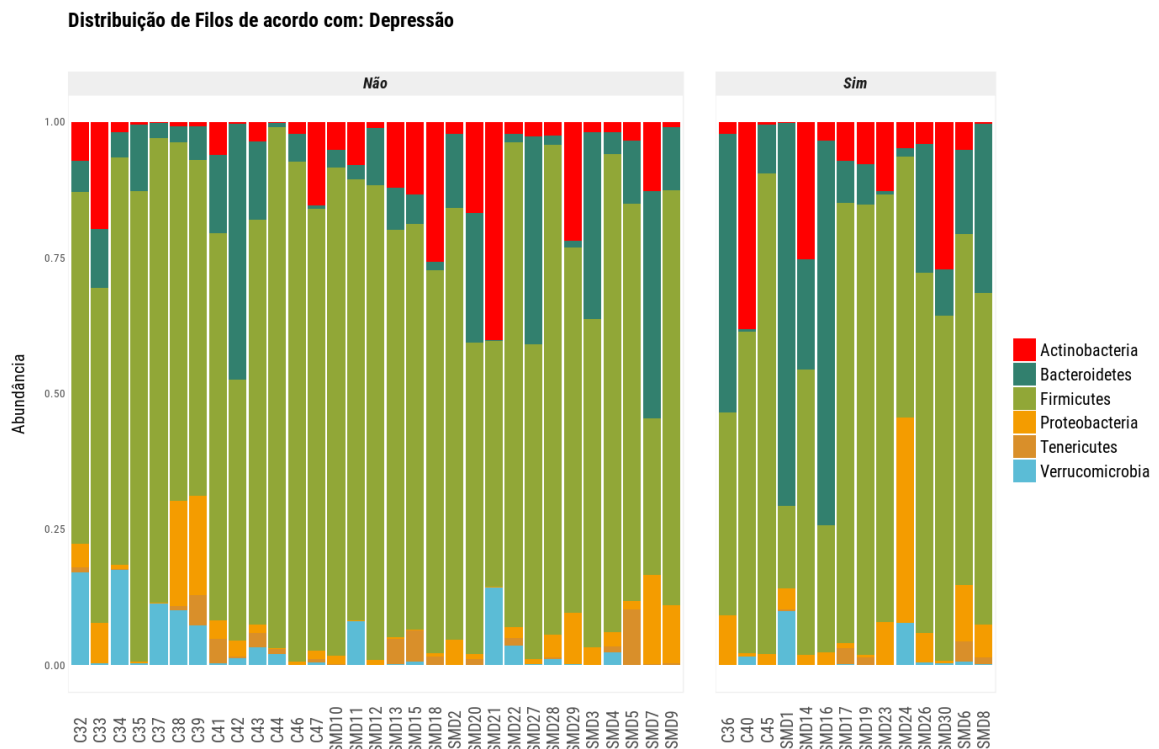
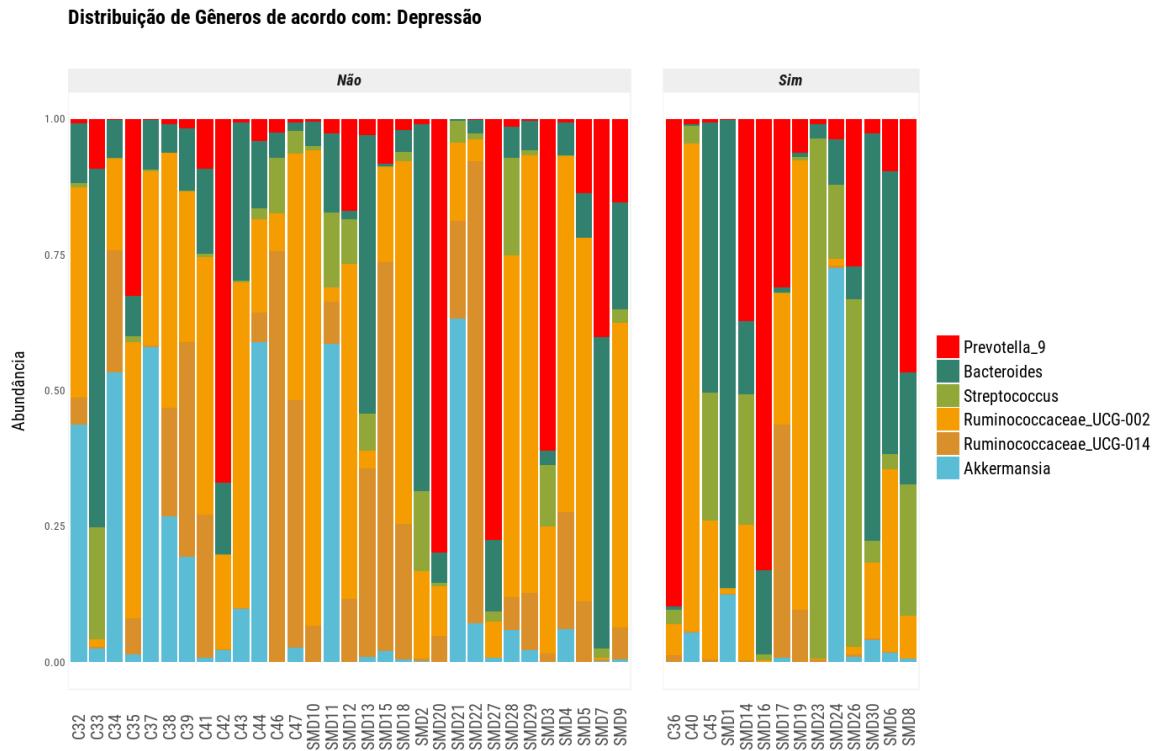
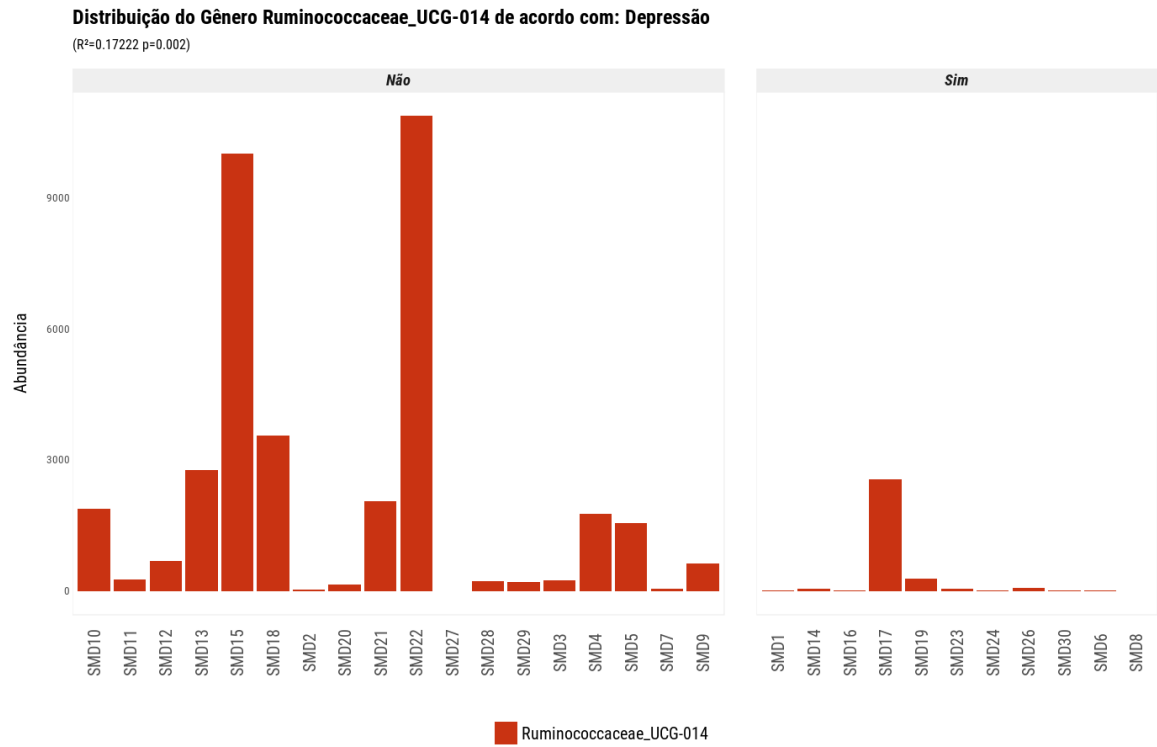


Gráfico 33 - Distribuição dos gêneros em relação aos grupos de pacientes não deprimidos e deprimidos.



No que se refere à análise das abundâncias dos gêneros (gráfico 33), o gênero *Ruminococcaceae* UCG-014 está significativamente ( $p=0.002$ ) menos abundante nos indivíduos deprimidos (gráfico 34).

Gráfico 34 - Distribuição do gênero *Ruminococcaceae* UCG-014 em relação aos grupos de pacientes não deprimidos e deprimidos.



## 6.5 Compilado dos resultados e suas associações

Para melhor compreensão dos resultados encontrados neste trabalho, o compilado dos achados mais relevantes segue descrito na tabela abaixo.

Tabela 3 - Compilado dos principais resultados.

Mudanças significativas da microbiota	Variável	
	SMD vs. SMD	SMD vs. Controles
↓ Firmicutes	Neutrófilos < 1000 / $\mu$ L (p=0.028)	-
↑ Actinobacteria	-	Subtipo AREB (p=0.063)
↓ Verrucomicrobia	Hb < 8 g/dL (p=0.007)	-
↓ Tenericutes	Etilismo (p=0.010)	-
↓ <i>Ruminococcus</i> spp.	Depressão (p=0.002)	Subtipo AREB (p=0.045)
↑ <i>Ruminococcus</i> spp.	Plaquetas < 50000 / $\mu$ L (p=0.007)	-
↓ <i>Akkermansia</i> spp.	IPSS alto (p=0.035)	IPSS alto (0.009)
	Hb < 8 g/dL (p=0.014)	-
↑ <i>Streptococcus</i> spp.	Subtipo AREB (p=0.06)	-
↑ <i>Prevotella</i> spp.	IPSS alto (p=0.029)	-
↓ <i>Prevotella</i> spp.	Uso de EPREX (p=0.008)	-

Com o intuito de facilitar a visualização das possíveis correlações entre os casos mais graves da doença e as variáveis analisadas, seguem os resultados reunidos abaixo na Tabela 4. Vale salientar que dos 6 pacientes do subtipo AREB, 4 deles apresentavam IPSS alto.

Tabela 4- Interseção entre os pacientes com SMD de alto risco e ocorrência das variáveis analisadas nesse grupo de pacientes.

	EPREX	Dep. transfusional	Hb < 8g/dL	Depressão
<b>IPSS alto (n=8)</b>	4	2	6	3
<b>Subtipo AREB (n=6)</b>	4	2	3	3

## 6.6 Relato de caso: Síndrome de Bloom

Tornou-se necessário estudar separadamente os resultados do sequenciamento da paciente SMD25, pois esta era portadora da síndrome de Bloom.

Paciente diagnosticada com síndrome mielodisplásica subtipo AREB, do sexo feminino, portadora da síndrome de Bloom, desnutrida (IMC 16.8), foi recebida no ambulatório de geriatria do Hospital Universitário Walter Cantídio aos 49 anos. Anteriormente colostomizada em decorrência de um carcinoma de cólon. A paciente não apresentava sinais depressivos, com pontuação 8 no inventário BECK. Por fazer uso de antibioticoterapia de rotina, a paciente foi analisada individualmente.

Figura 13 - Paciente SMD25 portadora da síndrome de Bloom.

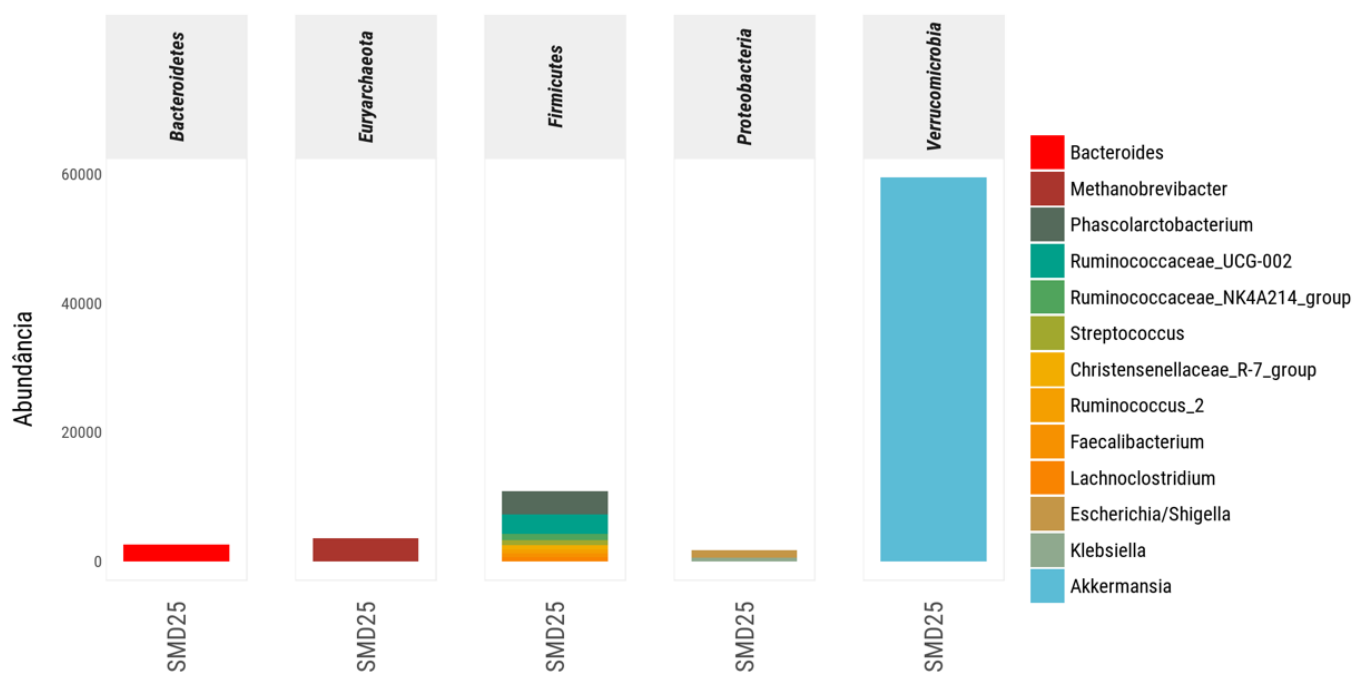


Legenda: a) déficit estatural e ponderal; b) Dolicocefalia e máculas hipocrômicas; c, d) Carcinoma basocelular. Fonte: Pinheiro, 2016.

De acordo com o sequenciamento da amostra fecal da paciente SMD25, observou-se uma predominância atípica do filo Verucomicrobia, em decorrência da presença exacerbada

do gênero *Akkermansia* sp. Notou-se também que a razão Firmicutes/Bacteroides também estava presente nesta paciente, apesar de sua idade não tão avançada (gráfico 35).

Gráfico 35 - Sequenciamento da amostra fecal da paciente SMD25.





## 7 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a correlação Bacteroidetes/Firmicutes, comum em indivíduos jovens, encontra-se invertida, havendo assim o predomínio do Filo Firmicutes, perfil esperado para indivíduos idosos, porém a razão entre esses filotaxas também depende dos hábitos alimentares e estilo de vida de cada indivíduo (MILLS et al., 2019). Adicionalmente, em nível decrescente de abundância, encontrou-se os filotaxas Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia.

Os membros dos gêneros do filotaxa Firmicutes encontrados em maior abundância foram *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp. e *Ruminococcus* sp., bem como as bactérias produtoras de butirato (ácidos graxos de cadeia curta - AGCC) *Eubacterium* sp., *Fecalibacterium* sp. e *Roseburia* sp., corroborando os achados de Hugenholtz e colaboradores (2017).

Por sua vez, dentre os gêneros membros do filotaxa Bacteroidetes, os mais abundantes foram *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp. e *Xylanibacter* sp.. *Bifidobacterium* sp. foi o gênero mais representativo do filotaxa Actinobacteria. Dentre as Proteobactérias destacou-se a presença de *Escherichia* sp. e *Desulfovibrio* sp., enquanto que para o filotaxa Verrucomicrobia encontrou-se o gênero *Akkermansia* sp.. Tais gêneros encontrados foram equivalentes aos descritos por Balzola e colaboradores (2010).

Assim, o presente trabalho dispõe apenas das abundâncias de filotaxa e gêneros apresentados pelos pacientes idosos de forma absoluta, seria necessário um estudo adicional que acrescentasse a análise das amostras de indivíduos adultos jovens a fim de comparar os perfis de microbiota em relação à variável idade e ao processo de senescência do organismo. Adicionalmente, diante dos achados obtidos, não foi observada diferença entre os grupos, controle e SMD, em relação à  $\alpha$ -diversidade, segundo os índices de Shannon e Simpson, nem em relação à riqueza, segundo índice de Chao.

Além da idade, diversos fatores influenciam na composição da microbiota intestinal. Em condições normais, os microrganismos do intestino têm que lidar com o estresse da limitação de ferro, dado que a presença de ferro "livre" (não ligado) disponível é provavelmente limitada devido às condições ambientais da luz do cólon. Essa situação adversa possivelmente se faz presente de forma intensificada na microbiota intestinal dos pacientes portadores da SMD, visto que as citopenias e os baixos níveis de ferro são as alterações mais frequentes da doença.

Neste estudo, associamos as mudanças de microbiota encontradas aos baixos níveis de hemoglobina detectados tanto nos pacientes com alto escore prognóstico IPSS, quanto nos pacientes com SMD de subtipo AREB (alto risco segundo classificação da OMS). Uma vez que, dos 8 pacientes classificados como IPSS alto, 7 deles apresentaram baixos níveis de hemoglobina (< 8g/dL). Vale lembrar que este parâmetro é uma das características analisadas para gerar o IPSS e que, em relação aos demais parâmetros medidos no cálculo do escore (cariótipo, porcentagem de blastos e citopenias). Seguindo o mesmo raciocínio, viu-se que dos 7 pacientes de subtipo AREB, 3 apresentaram baixos níveis de hemoglobina.

Vale destacar que os resultados obtidos aqui são inéditos, visto que, até o presente momento, nenhum grupo de pesquisa avaliou a relação da microbiota intestinal com a gravidade da SMD. Para os pacientes com IPSS alto, encontrou-se redução do filo Verrucomicrobia ( $p=0.045$ ). Em linha com este achado, Mulevicene e colaboradores (2018), observaram uma redução do filo Verrucomicrobia em pacientes com anemia ferropriva, quando comparados ao grupo controle.

Por outro lado, sabe-se que as condições de baixo teor de ferro são reconhecidas como causadoras de grandes mudanças na composição microbiana e selecionam o crescimento de bactérias que são boas sequestradoras de ferro, a exemplo das bifidobactérias (filo Actinobacteria) (MULEVICIENE et al., 2018), fato que pode justificar o aumento ( $p=0.014$ ) na abundância do filo Actinobacteria, que foi verificado para os pacientes enquadrados como subtipo AREB de SMD.

O equilíbrio de ferro ligado e não ligado no lúmen intestinal pode ser perturbado por tais intervenções terapêuticas, causando alterações na composição e no metabolismo da microbiota intestinal (KORTMAN et al., 2014). Deste modo, vale salientar que o tratamento da SMD visa, principalmente, amenizar as consequências das citopenias, com o uso de agentes estimuladores da eritropoiese (EPREX), suplementação de ferro (sulfato ferroso) e transfusões sanguíneas, a fim de melhorar a qualidade de vida (L. ADÈS, R. ITZYKSON, 2008),

No que se refere à terapêutica empregada, dos dez pacientes de alto risco (somando AREB e IPSS alto), que estavam sendo tratados com suplementação de ferro, três deles apresentavam dependência transfusional. Esses tipos de tratamento acabam por adicionar ferro ao organismo, e a elevação dos níveis de ferro, por meio de suplementação, promove, por exemplo, o aumento do gênero *Bacteroides* sp. (filo Bacteroidetes) e a redução do gênero

*Bifidobacterium* sp. (filo Actinobacteria) (ETTREIKI et al., 2012; KORTMAN et al., 2014; MULEVICIENE et al., 2018; YILMAZ; LI, 2018).

Em relação as diferenças observadas na abundância dos gêneros, foi visto um aumento significativo ( $p=0.06$ ) de *Streptococcus* sp. (filo Firmicutes) nos pacientes de subtipo AREB. Este gênero é capaz de crescer na presença ou na ausência de ferro, pois *Streptococcus* spp. pode utilizar o manganês como um metal de transição alternativo nas suas vias metabólicas (MULEVICIENE et al., 2018). Além do mais, esse grupo de bactérias é apto a degradar polifenóis, provenientes de taninos oriundos da alimentação, que se são responsáveis por se ligar fortemente ao ferro e evitar sua absorção pelo hospedeiro e por bactérias (KORTMAN et al., 2014). De modo agravante, com a degradação dos taninos e liberação de ferro para o lúmen intestinal, há o favorecimento adicional da proliferação de bactérias patogênicas.

Para os outros gêneros, observou-se o aumento significativo ( $p=0.019$ ) da proliferação do gênero *Prevotella* sp. (filo Bacteroidetes) em pacientes de IPSS alto. De fato, Kleiner e colaboradores (2016) relataram o aumento da abundância de *Prevotella* sp. 72 horas após suplementação com ferro.

Adicionalmente, alguns trabalhos mostraram que *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp., *Clostridium* sp., *Streptococcus* sp. e *Enterococcus* sp. podem produzir metabólitos genotóxicos, como sulfeto de hidrogênio e sais biliares secundários, que promovem inflamação, danos no DNA e carcinogênese no tecido epitelial intestinal (NICHOLSON et al., 2012). Enquanto que, na defesa da homeostase intestinal, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus* são comensais protetores do intestino contra a colonização por bactérias patogênicas, e produzem butirato que age como um agente anticancerígeno. Além disso, cepas de *Bifidobacterium* sp. podem afetar a formação de radicais livres, ligando o ferro à sua superfície, e promover a renovação diária do epitélio do cólon, enquanto cepas de *Lactobacillus* sp. podem reduzir o efeito mutagênico dos ácidos biliares (VIPPERLA; O'KEEFE, 2012).

Interessantemente, nosso estudo encontrou uma correlação negativa (-0.42) entre os gêneros *Prevotella* spp. e *Akkermansia* spp. em pacientes SMD. Esse fato pode propor uma ação protetora adicional promovida por *Akkermansia* spp., tal como a ação mediada por *Bifidobacterium* sp.. Essa suposta ação protetora pode estar comprometida, uma vez que a abundância de *Akkermansia* spp. encontra-se reduzida nos pacientes mais graves, facilitando assim o aumento da proliferação do gênero *Prevotella* spp..

Neste contexto, também foi observada uma redução ( $p=0.008$ ) significativa do gênero *Prevotella* spp. nos pacientes que estavam submetidos ao tratamento com EPREX. O que demonstra um possível efeito benéfico na microbiota, proporcionado pelo tratamento com alfaepoetina, que parece controlar a proliferação desse gênero.

No tocante aos demais parâmetros sanguíneos, usados no cálculo do escore prognóstico, foi vista correlação entre a mudança de microbiota e os níveis de plaquetas. De modo que a diminuição dos níveis de plaquetas ( $< 100000/\text{mm}^3$ ) foi proporcional ao aumento ( $p=0.007$ ) da abundância do gênero *Ruminococcus* sp. na microbiota intestinal.

Neste âmbito, sabe-se que o gênero *Ruminococcus*, em estudos anteriores, foi altamente correlacionado positivamente com os níveis plasmáticos de N-óxido de trimetilamina (TMAO) (WANG et al., 2015). Esse composto contribui diretamente para a agregação plaquetária, aumentando o potencial de trombose e, adicionalmente, do surgimento de aterosclerose. Os níveis elevados de TMAO no plasma em indivíduos predispõe ao risco de trombose, ataque cardíaco e acidente vascular cerebral (ZHU et al., 2016). Este achado pode não ter relevância clínica no âmbito de prever a ocorrência de trombose nesses pacientes, pois com os níveis de plaquetas diminuídos, o risco de formação de trombo também se encontra minimizado. No entanto, empiricamente, pode-se hipotetizar a existência de algum *feedback* negativo entre a abundância de *Ruminococcus* sp., com consequente aumento de TMAO sérico, e a produção de plaquetas pela medula óssea.

Outro achado relevante mediante as análises dos gêneros encontrados, referente aos pacientes com SMD, foi a redução significativa ( $p=0.009$ ) da abundância do gênero *Akkermansia* sp. (filo Verrucomicrobia). Esse gênero de bactéria, mais precisamente a espécie *Akkermansia muciniphila*, tem sido incluído na nova geração de bactéria benéfica (NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018).

É sabido ainda que adultos jovens abrigaram significativamente menos *Akkermansia* spp. do que os idosos, tanto em termos de prevalência e abundância. Além disso, descobriu-se que os centenários abrigam uma maior concentração de *Akkermansia* spp. e, proporcionalmente, os semi-supercentenários (indivíduos com uma idade de 105 ou mais) têm um nível ainda maior de *Akkermansia* spp. na microbiota intestinal. Propõe-se que *A. muciniphila* tenha um papel na saúde imunológica e metabólica das semi-supercentenárias, tornando-se um biomarcador para o envelhecimento saudável (GEERLINGS et al., 2018).

Neste contexto, o gênero *Akkermansia* spp., juntamente com *Bifidobacterium* spp., são os gêneros associados à saúde, de modo que sua abundância e / ou prevalência aumentam de maneira expressiva com o avançar da idade, e desempenham papéis na promoção da imunomodulação, na proteção contra a inflamação e na manutenção da homeostase intestinal. Assim sendo, tais gêneros são considerados marcadores de longevidade (BIAGI et al., 2016).

Como seu próprio nome sugere, *A. muciniphila* é responsável pela manutenção da camada de mucina, que reveste o epitélio intestinal. Para isso, *A. muciniphila* degrada a mucina, evitando o espessamento excessivo da camada, e estimula a produção dessa glicoproteína pelas células caliciformes do epitélio intestinal, impedindo que a camada torne-se muito delgada (DERRIEN; BELZER; DE VOS, 2017). Sabe-se que, devido ao ambiente reduzido no lúmen do cólon, o ferro pode formar complexos com a camada de mucina, certos aminoácidos, proteínas e outros componentes alimentares (YILMAZ; LI, 2018). O ferro ligado à mucina pode ser relativamente fácil de ser acessado, o que, hipoteticamente, ocorre por meio dos sideróforos de baixa afinidade  $\alpha$ -hidroxiácidos e  $\alpha$ -ceto-ácidos (KORTMAN et al., 2014). Pode-se supor assim que a presença de *A. muciniphila* mantém a camada de mucina, que funciona como um “depósito” de ferro, que pode ser acessado mais facilmente pelas bactérias intestinais, resultando na manutenção da homeostase desse microambiente.

Porém, a reduzida abundância dessa bactéria encontrada em pacientes IPSS alto ( $p=0.035$ ) e em pacientes com hemoglobina  $< 8$  g/dL ( $p=0.014$ ) dificulta ainda mais o acesso das bactérias a esse mineral, podendo agravar assim a disbiose intestinal presente nesse grupo de pacientes, que já possuem níveis baixos de ferro no organismo.

Nessa perspectiva, pode-se propor inclusive a ideia de que o aproveitamento do ferro, oriundo do tratamento com sulfato ferroso e transfusões sanguíneas, não é otimizado nesses pacientes. Uma vez que a barreira de mucina pode não estar bem estruturada, em decorrência dos níveis baixos de *A. muciniphila*, e, conseqüentemente, sua atuação no acesso ao ferro pelas bactérias intestinais pode estar comprometida.

Outro fator agravante para esse grupo de pacientes é o fato da bactéria *A. muciniphila* estar relacionada à resposta ao tratamento quimioterápico. Um recente estudo analisou a microbiota de pacientes com câncer de pulmão e carcinoma de células renais, e encontrou que níveis fecais de *A. muciniphila* estavam diretamente correlacionados com a eficácia da imunoterapia com anti-PD1 (anticorpos monoclonais direcionados à proteína de morte celular programada 1 [PD-1] presente em linfócitos). Nesse mesmo estudo, foi realizado

o transplante fecal em camundongos “germ-free”, que receberam fezes oriundas de pacientes não responsivos e responsivos à terapia. Os animais demonstraram a mesma resposta à terapia, que os pacientes dos quais receberam o transplante fecal e, adicionalmente, após a administração oral de *A. muciniphila* os animais não respondedores restauraram a resposta à imunoterapia (ROUTY et al., 2018).

No entanto, estudos são escassos a cerca da atuação desta bactéria nas quimioterapias convencionais. Entretanto, sabe-se que além do impacto na eficácia da quimioterapia, pacientes podem apresentar perfis de microbiota intestinal que favoreçam ou impeçam a eficácia do tratamento, bem como modulem a toxicidade do medicamento e seus efeitos colaterais (PANEBIANCO; ANDRIULLI; PAZIENZA, 2018). O presente trabalho não dispôs de um número representativo de pacientes submetidos à quimioterapia para que esse parâmetro pudesse ser avaliado, porém, diante dos presentes achados, espera-se que uma possível correlação entre *A. muciniphila* e a resposta aos quimioterápicos seja elucidada em estudos posteriores.

Em relação à variável dependência transfusional, não foi vista redução significativa do gênero *Akkermansia* sp. nos pacientes dependentes de transfusão sanguínea. No entanto, pode-se levantar a hipótese de que o equilíbrio dos níveis de ferro dos organismos sofra alterações, geradas pelas transfusões sanguíneas, podendo alterar a concentração deste mineral na microbiota e, conseqüentemente, alterar os níveis de abundância desse gênero. Além do ferro, demais metabólitos podem ser carregados para o organismo do receptor a partir das transfusões, alterações essas que podem influenciar na composição da microbiota intestinal. Entretanto, tal suposição necessita ser fundamentada por testes adicionais.

Além desse, muitos outros são os fatores que podem influenciar na diminuição da abundância de *A. muciniphila*. Ao contrário do que é comumente descrito na literatura, o presente trabalho não encontrou correlação significativa entre os altos níveis de gordura corporal (> 25%) e a abundância de *A. muciniphila*. Contudo, pode-se citar como uma possível causa a degradação de polifenóis presentes no intestino, resultante do aumento significativo de *Streptococcus*, observado na maioria dos pacientes que apresentaram redução de colonização por *A. muciniphila*. Dado que há relatos de que polifenóis derivados de uvas agem para aumentar a abundância de *A. muciniphila* no trato intestinal e que, como resultado, demonstrou-se houve a otimização da função da barreira intestinal (REUNANEN et al., 2015).

Outros achados também apontam para a atuação de *A. muciniphila* na manutenção da integridade da barreira intestinal, tais como o aumento dos níveis intestinais de endocanabinóides, implicados no controle da homeostase da barreira intestinal (KELLY et al., 2019), que tem sido relacionado ao aumento da abundância de *A. muciniphila* na microbiota (BLAND; EDITOR, 2016).

Quando há o comprometimento da função da barreira intestinal, ocorre o aumento de sua permeabilidade, que acaba por permitir a passagem de produtos do metabolismo bacteriano, assim como de seus constituintes, a exemplo dos lipopolissacarídeos (LPS), que gera ativação dos receptores do tipo toll-like (TLRs) presentes em diversas células do organismo, como micróglia, o que causa a liberação de citocinas inflamatórias no SNC (YARANDI et al., 2016). Curiosamente, dentre outros danos, o LPS pode causar alterações comportamentais durante uma infecção aguda ou até mesmo causar uma alteração tardia do humor após a doença. Há também relatos de que IgM contra LPS de bactérias intestinais são encontradas no sangue de pacientes com depressão, sugerindo um potencial papel do LPS e da perda de integridade da barreira intestinal na patogênese dessa doença (MAES et al., 2012). Mais recentemente foi visto aumento da proteína marcadora de permeabilidade intestinal, zonulina, e do LPS no sangue de pacientes deprimidos em relação aos controles ((STEVENS et al., 2017).

Dentre os 8 pacientes com IPSS alto, 3 deles apresentavam sintomas de depressão segundo a escala BECK. Fato que pode estar correlacionado ao possível aumento da translocação bacteriana e de seus componentes, facilitada pela redução de *A. muciniphila* e, consequentemente, do comprometimento da integridade da barreira intestinal.

Além disso, outras funções intestinais são comprometidas ao longo do processo de envelhecimento, pelo qual os pacientes participantes deste estudo estão passando. Dentre as alterações de funcionalidade do organismo, inclui-se o declínio das funções das células de Paneth do intestino ocasionando diminuição da produção de peptídeos antibacterianos e da imunidade da mucosa mediada por IgA; a imunosenescência, caracterizada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e da permeabilidade da junção célula-célula intestinal. Além disso, anatomicamente, há alteração da contratilidade da musculatura lisa e das inervações neurais das células do trato gastrointestinal (MAN; GICHEVA; NICOLETTI, 2014).

Ademais, a exposição concomitante a múltiplas drogas / antibióticos, que ocorre pela introdução de terapias com o passar da idade, juntamente com mudanças nos hábitos

alimentares, geram perturbações na composição nas funções do microbioma intestinal (disbiose) (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

O presente trabalho não encontrou diferença significativa na abundância dos filos na microbiota intestinal de pacientes com e sem sintomas de depressão. Entretanto, observou-se redução ( $p=0.002$ ) significativa na abundância do gênero *Ruminococcus* sp..

Corroborando os resultados do presente estudo, uma revisão sistemática, realizada por Fagiolini colaboradores (2019), descreveu que seis estudos, anteriores a 2018, relataram a redução do gênero *Ruminococcus* sp. em pacientes com depressão maior.

O gênero *Ruminococcus* sp. é considerado parte da população bacteriana produtora de acetato propionato e butirato, oriundo da degradação de carboidratos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), e que possuem propriedades neuroativas (YARANDI *et al.*, 2016). Uma diminuição nos níveis intestinais dessas bactérias relacionadas com a fermentação precipita um declínio na produção de AGCCs, que por sua vez causa disfunção da barreira intestinal (JIANG *et al.*, 2015), além da redução dos efeitos antidepressivos proporcionados diretamente pelo butirato, característica demonstrada por Bravo e colaboradores (2011).

Além do mais, foi descrita a participação do gênero *Ruminococcus* sp., na produção de neurotransmissores e neuromoduladores como produtos secundários do seu metabolismo. Podendo citar a produção do ácido gama-aminobutírico (GABA), que é um neurotransmissor inibitório importante no cérebro e os distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo ansiedade e depressão, têm sido associados à disfunção do sistema GABA (MILLS *et al.*, 2019). A diminuição da produção de GABA por *Ruminococcus* sp pode implicar no desequilíbrio da concentração desse neurotransmissor, agravando ainda mais os sintomas depressivos.

Outro composto que tem sua produção regulada por *Ruminococcus* sp. é o triptofano, precursor da serotonina. Crost e colaboradores (2018) demonstraram que sete genes de *R. bromii* são regulados na presença de *R. gnavus*. Estes genes, que incluem *trpA*, *B*, *C*, *D*, *E* e *G*, estão todos envolvidos na via biossintética do triptofano e são expressos quando nível de triptofano é baixo. Adicionalmente, *R. gnavus* é capaz de descarboxilar o triptofano à triptamina. Deste modo, nota-se a importância desse gênero na regulação da produção do triptofano, podendo-se inferir que, em baixos níveis de proliferação de *Ruminococcus* sp., a regulação da biossíntese desse aminoácido se dá de maneira deficiente e, na diminuição da concentração de seu precursor, há a redução da produção de serotonina, o que também pode intensificar os sintomas depressivos.



De modo contrário aos estudos que apontam o caráter benéfico dos níveis consideráveis de *Ruminococcus* sp. na microbiota intestinal, um estudo de Lukić e colaboradores (2019) revelou a importância de diminuir a proliferação da espécie *R. flavefaciens* para que os agentes antidepressivos alcancem seus efeitos terapêuticos, ou seja, para reduzir o comportamento depressivo. O mecanismo dessas ações bacterianas pode envolver o comprometimento da fosforilação oxidativa mitocondrial e a plasticidade neural reguladas por genes do córtex pré-frontal. Assim, pode-se supor que pacientes depressivos que apresentam redução na abundância do gênero *Ruminococcus* estão mais sujeitos a apresentar resposta ao tratamento com antidepressivos.

Além da depressão propriamente dita, existem inúmeras evidências que confirmam o papel da microbiota em transtornos de ansiedade e distúrbios comportamentais semelhantes (ZALAR; HASLBERGER; PETERLIN, 2018). Nesse contexto, sabe-se que o chamado “medo do câncer” (*fear of cancer recurrence* [FCR]) é considerado um sintoma psicológico independente, definido como o medo, ou preocupação em relação à possibilidade de o câncer voltar ou progredir. FCR também tem sido correlacionado com a presença de sintomas depressivos (JIANG et al., 2015). Um estudo de Okubo e colaboradores (2019) sugeriu que níveis mais altos do filo Bacteroidetes, encontrados em pacientes com altos índices de FCR, podem causar aumento da permeabilidade e inflamação da barreira intestinal e, assim, influenciar o FCR. Adicionalmente, esses pesquisadores viram que os índices mais altos de FCR foram significativamente associados com menor abundância relativa do gênero *Ruminococcus* spp..

Acreditando-se que a análise da sintomatologia FCR também pode ser aplicável para os casos de SMD, dado que esta doença pode ser considerada uma neoplasia, ou doença pré-maligna, os resultados do estudo acima citado fomentam os achados do presente trabalho, em que tanto os pacientes com IPSS alto, quanto os de subtipo AREB apresentaram redução significativa do gênero *Ruminococcus* spp., o que pode ter sido intensificado pela presença da sensação FCR, já que os pacientes sabiam da gravidade da SMD e muitos eram capazes de entender a doença como um tipo de câncer. No entanto, para confirmar tal suposição seria necessário aplicar o questionário, *Concerns About Recurrence Scale* (CARS) (OKUBO et al., 2019), a fim de verificar a presença e os graus de FCR apresentados pelos pacientes portadores de SMD.

Por último, em relação às variáveis nutricionais, também avaliadas no presente trabalho, notou-se apenas redução ( $p=0.010$ ) significativa do filo Tenericutes. De fato, Lowe e colaboradores (2017), observaram que camundongos que receberam quantidades de álcool em sua alimentação apresentaram redução significativa do filo Tenericutes. Essa redução, diante do consumo de álcool, pode ser explicada pelo fato de que o filo Tenericutes é conhecido por ter sua abundância reduzida sob condições inflamatórias (GEERLINGS et al., 2018), condições essas que podem ter sido geradas pelo caráter pro-inflamatório do hábito do consumo de álcool (LOWE et al., 2017).

Em conclusão, os achados do presente estudo mostram uma importante correlação entre alterações na microbiota intestinal e subtipos clínicos da SMD, bem como uma correlação inversa importante entre SMD de alto risco e os gêneros *Akkermansia* spp. e *Ruminococcus* spp., bem como deste último com a presença de sintomas de depressão. Este estudo, portanto, abre novas perspectivas para a condução de estudos clínicos com uso de estratégias probióticas para o tratamento da SMD e como forma preventiva ao surgimento de transtornos depressivos.

## 7.1 Relato de caso: Síndrome de Bloom

A paciente chamada neste trabalho de SMD25, a fim de preservar sua identidade, é portadora da Síndrome de Bloom, que é uma doença autossômica recessiva caracterizada por fotossensibilidade, retardo de crescimento, hipogonadismo, imunodeficiência e predisposição para desenvolvimento de malignidades (RESENDE et al., 2007).

Essa síndrome é causada por mutação no gene BLM (15q26.1), que codifica a proteína DNA helicase, essencial à manutenção da estabilidade cromossômica. A partir desse comprometimento, há aumento de *crossing-overs*, trocas entre cromátides irmãs, e formação de figuras tri ou quadri-radiais. A instabilidade cromossômica é responsável pelo fenótipo característico e pela propensão ao surgimento de malignidades, em especial à incidência de linfomas (FROTA et al., 2015). Esta última característica, pode justificar o fato da paciente ser também portadora da SMD.

Em concordância com as descrições na literatura a respeito da síndrome, a paciente SMD25 apresentava déficit estatural e ponderal, dolicocefalia, máculas hipocrômicas. Como

consequência da propensão ao surgimento de malignidades, a paciente, além dos carcinomas de pele apresentados, foi acometida por um câncer de colorretal, sendo por fim colostomizada.

Após sequenciamento da microbiota intestinal da paciente, notou-se o predomínio exacerbado do filo Verrucomicrobia, com discrepante abundância relativa de *Akkermansia* spp.. Corroborando esse achado, Sanapareddy e colaboradores (2012) relataram que a abundância do filo Verrucomicrobia foi significativamente aumentada em amostras de biópsia da mucosa de pacientes com adenoma colorretal. Similarmente, Dingemans e colaboradores (2015) concluíram que *A. muciniphila* e *Helicobacter typhlonius* são os principais candidatos para a modulação da gênese do tumor intestinal causado pela microbiota.

É possível supor assim que a predominância de *Akkermansia* spp. na microbiota intestinal da paciente SMD25 pode ter propiciado o surgimento do adenoma colorretal. No entanto, como não houve acesso à paciente anteriormente a colostomia, tal suposição não pôde ser confirmada.

No que se refere a possível causa elevada abundância dessa bactéria, há descrições de que o filo Verrucomicrobia, em especial o gênero *A. muciniphila*, foi encontrado em altas proporções (> 40%) na microbiota intestinal de pacientes que faziam uso prolongado de antibiótico de amplo espectro, sem que houvesse manifestações gastrointestinais significativas. Sugerindo que, devido à resistência apresentada a vancomicina, metronidazol e penicilina G, o gênero *Akkermansia* spp. pode suportar a antibioticoterapia, ao contrário de outros grupos de bactérias mais susceptíveis a esses fármacos. Tal fato pode explicar a exacerbação na proliferação intestinal do gênero *Akkermansia* spp. apresentada pela paciente SMD25, uma vez que essa fazia uso contínuo de antibioticoterapia profilática e terapêutica, em decorrência dos múltiplos processos infecciosos propiciados pela imunodeficiência típica da síndrome de Bloom.

Além disso, é conhecida também a correlação inversa da abundância de *A. muciniphila* com o ganho de peso (KARLSSON et al., 2012). Neste âmbito, foi descrito que a abundância desta bactéria no microbioma intestinal é diretamente proporcional à expressão de genes ligados ao metabolismo e síntese de gordura em tecidos adiposos de camundongos (SCHNEEBERGER et al., 2015). Neste âmbito, foi relatado o surgimento de quadros de desnutrição em ratos que apresentavam aumento da abundância de *A. muciniphila* na microbiota intestinal, possivelmente pela promoção exagerada da metabolização da gordura no organismo do animal (PREIDIS et al., 2015). Assim, é interessante levantar a hipótese de que o quadro de

desnutrição, que acompanha os pacientes portadores da síndrome de Bloom, também observado na paciente SMD25 (IMC 16.8), pode ser agravado pela colonização acentuada de *A. muciniphila* na microbiota intestinal.

Desta forma, tal caso clínico traz à tona a observação que, para a manutenção da homeostase intestinal, a colonização de *A. muciniphila* deve ocorrer de modo equilibrado na microbiota. Ambos extremos, baixa e alta proliferação desta bactéria, ocasionam danos ao organismo. No contexto, os altos níveis da abundância relativa dessa bactéria podem ter precipitado a intensificada degradação da camada de muco intestinal, facilitando a translocação bacteriana e os processos inflamatórios sistêmicos; a alteração das vias de metabolização de gordura, resultando em quadros de desnutrição; e, de modo mais grave, a ocorrência de adenoma colorretal.

Mais análises acerca dessa paciente seriam de grande valia, porém tal paciente evoluiu a óbito, em decorrência de um quadro grave de pneumonia, poucos meses após sua participação nesta pesquisa.

## 7.2 Limitações e Perspectivas

O presente estudo apresenta algumas limitações que podem ser suplantadas em estudos futuros. De forma geral, a principal limitação deste estudo foi a avaliação da microbiota de pacientes já em tratamento para a SMD e em apenas um momento (estudo transversal). Estudos futuros precisam ser desenhados para avaliar as alterações na microbiota fecal de pacientes recém-diagnosticados, bem como ao longo da doença (estudos longitudinais), de forma a se avaliar, de maneira mais precisa, o efeito preditivo da microbiota em relação ao prognóstico da doença e ao efeito do tratamento. Este tipo de abordagem se faz necessária de forma a se implementar em um futuro próximo estratégias terapêuticas a base de probióticos e/ou prebióticos como forma de influenciar o curso clínico da SMD, bem como melhorar o efeito dos fármacos utilizados no tratamento desta síndrome tão grave e fatal. Em conjunto, estas estratégias podem influenciar um melhor prognóstico para a SMD.

## 8 CONCLUSÃO

- Os subtipos clínicos graves de SMD, bem como o alto escore IPSS, estão ligados ao detrimento do filo protetor Verrucomicrobia;
- Os subtipos clínicos graves de SMD, bem como o alto escore IPSS, estão ligados ao aumento dos gêneros *Prevotella* spp. e *Streptococcus* spp., que podem comprometer a homeostase intestinal;
- As terapêuticas usadas para SMD, tais como suplementação com ferro, estimuladores da eritropoiese e transfusões sanguíneas parecem interferir na composição da microbiota intestinal dos pacientes;
- A redução dos gêneros *Akkermansia* spp. e *Ruminococcus* spp., importantes para a manutenção da barreira intestinal e regulação de neurotransmissores, pode influenciar na saúde imunológica e metabólica dos pacientes de subtipos clínicos graves de SMD;
- A redução da abundância do gênero *Ruminococcus* spp. caracteriza um perfil de microbiota peculiar nos pacientes SMD com sintomas de depressão.

## REFERÊNCIAS

- ALBENBERG, L. G.; WU, G. D. Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease Diet and the Early Intestinal Microbiota. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1564–1572, 2014.
- ALCOCK, J.; MALEY, C. C.; AKTIPIS, C. A. Prospects & Overviews Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms. **Bioessays Journal**, p. 940–949, 2014.
- ANDERSON, M.; GORLEY, R. N.; CLARKE, K. R. PERMANOVA + for PRIMER user manual. v. 1, p. 1:218, 2008.
- ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 2011.
- BALZOLA, F. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary. **Inflammatory Bowel Disease Monitor**, v. 11, n. 1, p. 28, 2010.
- BENEDICT, C. et al. Gut microbiota and glucometabolic alterations in response to recurrent partial sleep deprivation in normal-weight young individuals. **Molecular Metabolism**, p. 1175 - 1186, 2016.
- BENNETT, J. M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. **British Journal of Haematology**, v. 33, n. 4, p. 451–458, 1976.
- BIAGI, E. et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. **Current Biology**, v. 26, 2016.
- BINDELS, L. B. et al. Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. **British Journal of Cancer**, v. 107, p. 1337–1344, 2012.
- BLAND, J.; EDITOR, A. Intestinal Microbiome, Akkermansia muciniphila, and Medical. **Integrative Medicine** •, v. 15, n. 5, 2016.
- BLASER, M. J. **Missing microbes: how the overuse of antibiotics is fueling our modern plagues**. Macmillan; 2014; New York City, NY. [s.l: s.n.].
- BRAVO, J. A. et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2011.
- BULTMAN, S. J. Molecular pathways: Gene-environment interactions regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 799–803, 2014.
- CALLAHAN, B. Silva taxonomic training data formatted for DADA2. 2018.
- CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nat Methods**., v. 13, p. 581–583, 2016.

- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, p. 2639–2643, 2017.
- CANEVELLI, M. et al. Of Microbes and Minds: A Narrative Review on the Second Brain Aging. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 53, 2018.
- CHAMSEDDINE, A. N. et al. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2016.
- CHUMLEA, W. C. et al. Body composition estimates from NHANES III bioelectrical impedance data. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. 1596–1611, 2002.
- CLAESSON, M. J. et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. **Nature**, v. 488, p. 178 - 185, 2012.
- COOK, M. D. et al. Exercise and gut immune function: Evidence of alterations in colon immune cell homeostasis and microbiome characteristics with exercise training. **Immunology and Cell Biology**, v. 94, n. 2, p. 158–163, 2016.
- RESENDE A. C. B. et al. Você conhece esta síndrome? **An Bras Dermatol**, p. 363 - 365, 2007.
- CROST, E. H. et al. Mechanistic insights into the cross-feeding of *Ruminococcus gnavus* and *Ruminococcus bromii* on host and dietary carbohydrates. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–13, 2018.
- CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 701–12, out. 2012.
- DAO, M. C. et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. **Gut**, v. 65, n. 3, p. 426–436, 2016.
- DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–63, 2014.
- DERRIEN, M. et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1469–1476, 2004.
- DERRIEN, M.; BELZER, C.; DE VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 171–181, 2017.
- DETHLEFSEN, L.; RELMAN, D. A.; BECKMAN CENTER, M. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. **Sciences**, v. 108, n. 1, 2010.
- DIAS, S. C. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 373–379, 2009.

DINGEMANSE, C. et al. Akkermansia muciniphila and Helicobacter typhlonius modulate intestinal tumor development in mice. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 11, p. 1388–1396, 2015.

ECKBURG, P. B. et al. **Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora**. [s.l.: s.n.].

EHMANN, D. et al. Paneth cell  $\alpha$ -defensins HD-5 and HD-6 display differential degradation into active antimicrobial fragments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 9, p. 3746–3751, 2019.

ESTAKI, M. et al. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. **Microbiome**, v. 4, p. 1–13, 2016.

ETTREIKI, C. et al. Juvenile ferric iron prevents microbiota dysbiosis and colitis in adult rodents. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 21, p. 2619–2629, 2012.

EVERARD, A. et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 2013.

FAGIOLINI, A. et al. Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. **Frontiers in Psychiatry | www.frontiersin.org**, v. 10, p. 34, 2019.

FERRUCIO, J. M. X. *Autorrenovação de células-tronco hematopoiéticas: Papel da via Hedgehog na mielodisplasia e da Arhgap21 na hematopoiese*. 2015. Tese (Doutorado em Fisiologia Médica). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

FROTA, A. S. et al. Síndrome de Bloom: relato de dois casos. **Revista de Medicina da UFC**, v. 55, n. 1, p. 52, 2015.

GANDINI, R. C. et al. Inventário de Depressão de Beck-BDI: validação fatorial para mulheres com câncer 1 Beck Depression Inventory-BDI: Factorial analysis for women with cancer. **Psico-USF**, n. 1, p. 23–31, 2007.

GEERLINGS, S. Y. et al. microorganisms Akkermansia muciniphila in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? **Microorganisms**, v. 6, 2018.

GEVERS, D. et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 3, p. 382–392, 2014.

GIAGOUNIDIS, A.; HAASE, D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, v. 26, n. 4, p. 337–353, 2013.

GILBERT, J. A. et al. Current understanding of the human microbiome. **Nature Medicine**, v. 24, n. 4, p. 392–400, 2018.

GREENBERG, P. et al. **International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes from patients with primary MDS from seven previously re**. [s.l.: s.n.].

GREENBERG, P.; TUECHLER, H. Revised international prognostic scoring system for



- myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454–2465, 2012.
- GROVER, A. et al. Single-cell RNA sequencing reveals molecular and functional platelet bias of aged haematopoietic stem cells. **Nature communications**, 2016.
- HAMID, G. A.; AL-NEHMI, A. W.; SHUKRY, S. Diagnosis and Classification of Myelodysplastic Syndrome. **School of Environmental Sciences**, 2019.
- HUGENHOLTZ, F. et al. Feasibility of Metatranscriptome Analysis from Infant Gut Microbiota: Adaptation to Solid Foods Results in Increased Activity of Firmicutes at Six Months. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, 2017.
- JIANG, H. et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. **Brain, behavior, and immunity**, v. 48, p. 186–194, 13 abr. 2015.
- JOLY, C. et al. Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) and in the rat. **ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY**, 2013.
- JONAS, B. A.; GREENBERG, P. L. MDS Prognostic Scoring Systems-Past, Present, and Future. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 28, p. 3–13, 2014.
- JOSEFSDOTTIR, K. S. et al. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 729–739, 2017.
- KARLSSON, C. L. J. et al. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. **Obesity**, v. 20, n. 11, p. 2257–2261, 2012.
- KELLY, J. R. et al. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. **Journal of Psychiatric Research**, v. 82, p. 109–118, 2016.
- KELLY, R. et al. Metabolomics and Communication Skills Development in Children; Evidence from the Ages and Stages Questionnaire. **Metabolites**, v. 9, n. 3, p. 42, 2019.
- KLEINER, M. et al. Microbial Metabolism Shifts Towards an Adverse Profile with Supplementary Iron in the TIM-2 In vitro Model of the Human Colon. **Frontiers in Microbiology** | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org), v. 1, p. 1481, 2016.
- KORTMAN, G. A. M. et al. Nutritional iron turned inside out: intestinal stress from a gut microbial perspective. **FEMS Microbiol Rev**, v. 38, p. 1202–1234, 2014.
- L. ADÈS, R. ITZYKSON, P. F. Myelodysplastic syndromes. **Seminar**, v. 6736, n. 13, p. 1–14, 2008.
- LAURENTI, E.; GÖTTGENS, B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 418–426, 2018.
- LE BASTARD, Q. et al. Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, n. 3, p. 332–

345, 2018.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–217, jun. 2013.

LOWE, P. P. et al. Alcohol-related changes in the intestinal microbiome influence neutrophil infiltration, inflammation and steatosis in early alcoholic hepatitis in mice. **PLOSone**, p. 1–16, 2017.

LUKIĆ, I. et al. Antidepressants affect gut microbiota and *Ruminococcus flavefaciens* is able to abolish their effects on depressive-like behavior. **Translational Psychiatry**, v. 9, 2019.

MA, X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **Am J Med**, v. 125, n. 7, p. 2–5, 2012.

MAES, M. et al. Increased IgA responses to the LPS of commensal bacteria is associated with inflammation and activation of cell-mediated immunity in chronic fatigue syndrome. **Journal of Affective Disorders**, 2012.

MAN, A. L.; GICHEVA, N.; NICOLETTI, C. The impact of ageing on the intestinal epithelial barrier and immune system. **Cellular Immunology**, v. 289, n. 1–2, p. 112–118, maio 2014.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. v. 3, p. 1–3, 2015.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads kenkyuhi hojokin gan rinsho kenkyu jigyo. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2013.

MAYNARD, C. L. et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231–41, 2012a.

MAYNARD, C. L. et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231–241, set. 2012b.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE** |, v. 8, n. 4, 2013.

MILANI, C. et al. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study OPEN. **Nature Publishing Group**, 2016.

MILLER, A. W. et al. Loss of function dysbiosis associated with antibiotics and high fat, high sugar diet. **ISME Journal**, 2019.

MILLS et al. Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 923, 2019.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Gut Microbes Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut microbes**, v. 7, p. 189–200, 2016.

MULEVICIENE, A. et al. Iron deficiency anemia-related gut microbiota dysbiosis in infants and young children: A pilot study. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 65,

n. 4, p. 551–564, dez. 2018.

MUNUKKA, E. et al. Six-week endurance exercise alters gut metagenome that is not reflected in systemic metabolism in over-weight women. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, 2018.

NAGPAL, R. et al. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights  
Abbreviations 5-HT 5-hydroxytryptamine AMP antimicrobial peptides CNS central nervous system CRP C-reactive protein DC dendritic cells. **Nutrition and Healthy Aging**, v. 4, p. 267–285, 2018.

NAITO, Y.; UCHIYAMA, K.; TAKAGI, T. A nexttgeneration beneficial microbe: Akkermansia muciniphila. **J. Clin. Biochem. Nutr**, v. 63, n. 1, p. 33–35, 2018.

NASERIBAFROUEI, A. et al. Correlation between the human fecal microbiota and depression. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 26, n. 8, p. 1155–1162, 2014.

NHLBI. **Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults.** [s.l: s.n.].

NICHOLSON, J. K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262–1267, 2012.

OKUBO, R. et al. Impact of chemotherapy on the association between fear of cancer recurrence and the gut microbiota in breast cancer survivors. **Brain, Behavior, and Immunity**, n. January, p. 0–1, 2019.

ORÍÁ, R. B. et al. *Sistema digestório: integração básico-clínica.* 1 ed. São Paulo: Blucher, 2016.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements Dietary Reference Intakes DRI**, 2006.

PANEBIANCO, C. et al. Influence of gemcitabine chemotherapy on the microbiota of pancreatic cancer xenografted mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 773–782, 2018.

PANEBIANCO, C.; ANDRIULLI, A.; PAZIENZA, V. Pharmacomicrobiomics: exploiting the drug-microbiota interactions in anticancer therapies. **Microbiome**, v. 6, 2018.

PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **BLOOD**, v. 122, p. 22, 2013.

PARFREY, L. W. et al. Spatial and temporal variability of the human microbiota. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, p. 5–7, 2012.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism. **Nat Rev Endocrinol.** , v. 12, p. 743–754, 2012.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 1110 - 1112, 2009.

- PREIDIS, G. A. et al. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 1050–1057, 2015.
- REUNANEN, J. et al. Akkermansia muciniphila Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 3655–3662, 2015.
- RICH, S. S. et al. Gut Microbiomes of Malawian Twin Pairs Discordant for Kwashiorkor. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 548–554, 2013.
- RIDAURA, V. K. et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. **Science**, v. 341, n. 6150, p. 1–22, 2013.
- ROAGER, H. M.; LICHT, T. R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. **Nature communications**, v. 9, p. 3294–3304, 2018.
- ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, 2016.
- ROUTY, B. et al. **Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors.** [s.l: s.n.].
- SANAPAREDDY, N. et al. Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. **The ISME Journal**, v. 6, 2012.
- SARANGI, A. N.; GOEL, A.; AGGARWAL, R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 62–73, 2019.
- SCHNEEBERGER, M. et al. Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice OPEN. **Nature Publishing Group**, v. 5, p. 16643, 2015.
- SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 337–340, 2016.
- SHEHATA, A. A. et al. The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota In Vitro. **Current Microbiology**, v. 66, p. 350–358, 2013.
- STEVENS, B. R. et al. Increased human intestinal barrier permeability plasma biomarkers zonulin and FABP2 correlated with plasma LPS and altered gut microbiome in anxiety or depression. **Gut**, p. gutjnl-2017-314759, 2017.
- STEWART, C. J. et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. **Nature**, v. 562, p. 583–590, 2018.
- STILLING, R. M. et al. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? **Neurochemistry International**, v. 99, p. 110–132, 2016.
- SUAU, A. et al. Direct analysis of genes encoding 16s rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. **Applied and Environmental**

**Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4799 - 4807, 2018.

SWERDLOW, S. H. et al. Review Series THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, 2016.

SWERSLOW, S. H. ET AL. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues . 4th edition. Lyon, France: IARC Press, 2008.** [s.l: s.n.].

THOMAS, V.; CLARK, J.; DORÉ, J. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. **Future Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 1485–1504, set. 2015.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 107–116, 2010.

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

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A.. Quantitative Analysis and Distribution of the Population of Species in the Genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) on Luiz de Queiroz. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 33-39, 2005.

VAN VLIET, M. J. et al. The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 5, 2010.

VIPPERLA, K.; O'KEEFE, S. J. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 5, p. 624–635, 2012.

VON MUTIUS, E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 3, p. 680–689, 2016.

WANG, Z. et al. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis assisted in gene cloning, protein purification, choline transport and TMA lyase activity assay HHS Public Access. **Cell**, v. 163, n. 7, p. 1585–1595, 2015.

WICKHAM, H. **ggplot2: elegant graphics for data analysis**, 2009.

YAN, H.; BALDRIDGE, M. T.; KING, K. Y. Hematopoiesis and the bacterial microbiome. **Blood**, v. 132, n. 6, p. 559–564, 2018.

YARANDI, S. S. et al. Modulatory effects of gut microbiota on the central nervous system: How gut could play a role in neuropsychiatric health and diseases. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 22, n. 2, p. 201–212, 2016.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–7, 14 jun. 2012.

YILMAZ, B.; LI, H. Gut Microbiota and Iron: The Crucial Actors in Health and Disease. **Pharmaceuticals**, v. 11, 2018.

ZALAR, B.; HASLBERGER, A.; PETERLIN, B. THE ROLE OF MICROBIOTA IN DEPRESSION-A BRIEF REVIEW. **Psychiatria Danubina**, v. 30, n. 2, p. 136, 2018.

ZHU, W. et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk HHS Public Access. **Cell**, v. 165, n. 1, p. 111–124, 2016.

ZUBCEVIC, J. et al. The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 49, 2018.

## ANEXO I - INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO BECK

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve **melhor** a maneira que você tem se sentido na **última semana, incluindo hoje**. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. **Tome cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer sua escolha.**

1	0 Não me sinto triste 1 Eu me sinto triste 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar	7	0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo 1 Estou decepcionado comigo mesmo 2 Estou enojado de mim 3 Eu me odeio
2	0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro 2 Acho que nada tenho a esperar 3 Acho o futuro sem esperanças e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar	8	0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros 1 Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece
3	0 Não me sinto um fracasso 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum 2 Quando olho pra trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso	9	0 Não tenho quaisquer ideias de me matar 1 Tenho ideias de me matar, mas não as executaria 2 Gostaria de me matar 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade

4	<p>0 Tenho tanto prazer em tudo como antes</p> <p>1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes</p> <p>2 Não encontro um prazer real em mais nada</p> <p>3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo</p>	10	<p>0 Não choro mais que o habitual</p> <p>1 Choro mais agora do que costumava</p> <p>2 Agora, choro o tempo todo</p> <p>3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queria</p>
5	<p>0 Não me sinto especialmente culpado</p> <p>1 Eu me sinto culpado grande parte do tempo</p> <p>2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo</p> <p>3 Eu me sinto sempre culpado</p>	11	<p>0 Não sou mais irritado agora do que já fui</p> <p>1 Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava</p> <p>2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo</p> <p>3 Não me irrita mais com coisas que costumavam me irritar</p>
6	<p>0 Não acho que esteja sendo punido</p> <p>1 Acho que posso ser punido</p> <p>2 Creio que vou ser punido</p> <p>3 Acho que estou sendo punido</p>	12	<p>0 Não perdi o interesse pelas outras pessoas</p> <p>1 Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar</p> <p>2 Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas</p> <p>3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas</p>
13	<p>0 Tomo decisões tão bem quanto antes</p> <p>1 Adio as tomadas de decisões mais do que costumava</p> <p>2 Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes</p> <p>3 Absolutamente não consigo mais tomar decisões</p>	18	<p>0 O meu apetite não está pior do que o habitual</p> <p>1 Meu apetite não é tão bom como costumava ser</p> <p>2 Meu apetite é muito pior agora</p> <p>3 Absolutamente não tenho mais apetite</p>
14	<p>0 Não acho que de qualquer modo pareço pior do que antes</p> <p>1 Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo</p> <p>2 Acho que há mudanças permanentes na minha aparência, que me fazem parecer sem atrativo</p> <p>3 Acredito que pareço feio</p>	19	<p>0 Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente</p> <p>1 Perdi mais do que 2 quilos e meio</p> <p>2 Perdi mais do que 5 quilos</p> <p>3 Perdi mais do que 7 quilos</p> <p>Estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: Sim _____ Não _____</p>



15	<p>0 Posso trabalhar tão bem quanto antes</p> <p>1 É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa</p> <p>2 Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa</p> <p>3 Não consigo mais fazer qualquer trabalho</p>	20	<p>0 Não estou mais preocupado com a minha saúde do que o habitual</p> <p>1 Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou constipação</p> <p>2 Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa</p> <p>3 Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa</p>
16	<p>0 Consigo dormir tão bem como o habitual</p> <p>1 Não durmo tão bem como costumava</p> <p>2 Acordo 1 a 2 horas mais cedo do que habitualmente e acho difícil voltar a dormir</p> <p>3 Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir</p>	21	<p>0 Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo</p> <p>1 Estou menos interessado por sexo do que costumava</p> <p>2 Estou muito menos interessado por sexo agora</p> <p>3 Perdi completamente o interesse por sexo</p>
17	<p>0 Não fico mais cansado do que o habitual</p> <p>1 Fico cansado mais facilmente do que costumava</p> <p>2 Fico cansado em fazer qualquer coisa</p> <p>3 Estou cansado demais para fazer qualquer coisa</p>		<p><b>Total:</b></p>

## ANEXO II - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES SANGÜÍNEOS DE PACIENTES COM TRANSTORNO DE HUMOR UNIPOLAR E PORTADORES DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

**Pesquisador:** Giovanna Riello Barbosa Correia

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 58761816.2.0000.5054

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Ceará/ PROPESQ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.726.143

#### Apresentação do Projeto:

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é a neoplasia primária da medula óssea mais comum do mundo ocidental originada a partir de um conjunto heterogêneo de malignidade relacionada às células tronco hematopoéticas. Os sinais mais frequentes são displasias das células da medula óssea (MO) que se caracterizam pelo aumento da apoptose, resultando em citopenias no sangue periférico e risco de progressão para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) em até 30% dos casos. A SMD é mais comum em pacientes acima de 60 anos. Juntamente com os sintomas fisiológicos da SMD estão os sintomas psicológicos. Os pacientes são confrontados com os desafios, no curso clínico instável de sua doença, podendo desenvolver ansiedade e depressão. A perturbação da estabilidade emocional pode resultar em complicações incluindo citopenias graves e, em casos mais intensos, progressão para LMA. Alterações na composição da microbiota intestinal são um dos fatores relacionados à patogênese de diversas doenças, incluindo a depressão. Adicionalmente, sabe-se que alterações nos níveis de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), alterações oxidativas e inflamatórias também correlacionam-se com esse transtorno de humor. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo utilizar a biblioteca genômica RNAr 16S como ferramenta para a caracterização da microbiota fecal, além disso, investigar alterações em biomarcadores

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3386-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.726.143

inflamatórios, oxidativos, neurotóxicos e LPS sanguíneo em pacientes portadores de SMD, correlacionando os achados com a presença de sintomas de depressão. Para tanto, serão coletadas amostras fecais e sanguíneas de 100 idosos distribuídos em quatro grupos: idosos portadores de SMD com e sem sintomas de depressão e idosos saudáveis com e sem sintomas de depressão. O perfil da microbiota será analisado pela técnica de sequenciamento gênico e os parâmetros sanguíneos serão avaliados por meio da técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) e espectrofotometria. O projeto tem como intuito elucidar qual a correlação entre o perfil da microbiota intestinal e os processos inflamatórios, oxidativos, neurotróficos com a presença de transtorno de humor unipolar em pacientes portadores de SMD.

**Objetivo da Pesquisa:**

Utilizar a biblioteca genômica RNAr 16S como ferramenta para a caracterização da microbiota fecal e investigar alterações em biomarcadores inflamatórios, oxidativos, neurotóxicos e LPS sanguíneo de pacientes portadores da Síndrome Mielodisplásica, correlacionando os achados com a presença de transtorno de humor unipolar.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Caso haja algum constrangimento em relação às perguntas do questionário, o participante poderá interromper a entrevista a qualquer momento. Durante a punção venosa poderá ocorrer algum grau de desconforto, risco mínimo de sangramento e formação de hematoma no local da punção venosa. O participante deste estudo não terá nenhum benefício direto pela sua colaboração na pesquisa. Entretanto, o possível benefício provenientes da pesquisa é proporcionar a realização de um estudo que traga mais explicações acerca da influência das bactérias benéficas do intestino no desenvolvimento da Síndrome Mielodisplásica e na depressão. Os achados durante o estudo servirão de base para possíveis programas de tratamento inovadores, que possibilitem a melhoria na qualidade de vida desse grupo de pacientes.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Acredita-se que a composição da microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome Mielodisplásica desempenha uma importante função no eixo bidirecional que integra o intestino e o Sistema Nervoso Central. De modo que alguns dos perfis de microbiota intestinal podem favorecer o surgimento de transtornos depressivos unipolares e afetar o desenvolvimento da doença. E, de modo inverso, a presença da SMD poderá afetar a composição da microbiota dos indivíduos em comparação aos indivíduos saudáveis. Além disso, é possível supor que a depressão

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275  
UF: CE Município: FORTALEZA  
Telefone: (85)3386-8344 E-mail: comepe@ufc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ**



Continuação do Parecer: 1.726.143

é capaz de causar um pior prognóstico no tratamento da SMD, devido a um aumento em citocinas pró-inflamatórias, queda de neurotrofinas, aumento de processos oxidativos e LPS sanguíneo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados. A pesquisadora refez TCLE incluindo os riscos mínimos associados a punção venosa e desconforto gerado pela coleta de sangue bem como versão e data da última modificação.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_768753.pdf	22/08/2016 11:41:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SMD_Giovanna_Riello.pdf	22/08/2016 11:32:44	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Outros	06_CV_Monique.pdf	12/08/2016 10:42:46	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Outros	06_CV_DrRonald.pdf	12/08/2016 10:42:30	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Outros	06_CV_David_Freitas.pdf	12/08/2016 10:42:17	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Outros	06_CV_Danielle_Macedo.pdf	12/08/2016 10:42:00	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Outros	11_anuencia_drrenan.pdf	12/08/2016 10:40:10	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	05_autorizacao_da_unidade_clinica_medicina.pdf	12/08/2016 10:39:35	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Folha de Rosto	01_folha_rosto.pdf	09/08/2016 10:16:51	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Outros	Utilizacao_Dados.pdf	03/08/2016 14:19:59	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Outros	Declaracao_Fiel_Depositario.pdf	03/08/2016	Giovanna Riello	Aceito

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3386-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.726.143

Outros	Declaracao_Fiel_Depositario.pdf	14:19:06	Barbosa Correia	Aceito
Outros	Carta_Apreciacao_Comite.pdf	03/08/2016 14:18:05	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Outros	Curriculo_lattes_Giovanna_Riello.pdf	03/08/2016 14:17:10	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_SMD_Giovanna.pdf	03/08/2016 14:14:12	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	03/08/2016 14:13:30	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Concordancia.pdf	03/08/2016 14:13:02	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Institucional.pdf	03/08/2016 14:12:18	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	03/08/2016 14:11:47	Giovanna Riello Barbosa Correia	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 14 de Setembro de 2016

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA  
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

## **APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PESQUISA: “Caracterização da microbiota intestinal e investigação de biomarcadores sanguíneos de pacientes com transtorno de humor unipolar e portadores da Síndrome Mielodisplásica”

Coordenador: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

**Prezado (a) colaborador (a),**

Você é convidado(a) a participar desta pesquisa, que tem como título “Caracterização da microbiota intestinal e investigação de biomarcadores sanguíneos de pacientes com transtorno de humor unipolar e portadores da Síndrome Mielodisplásica”, e envolve um grupo de profissionais clínicos para o seu melhor atendimento. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

**1. PARTICIPANTES DA PESQUISA:** Sua participação, assim como dos outros convidados, ocorrerá por livre e espontânea vontade, participando da pesquisa somente os voluntários que forem convidados e concordem em colaborar.

**2. ENVOLVIMENTO NA PESQUISA:** Ao participar deste estudo você deve responder a 3 (três) questionários: envolvendo (1) Perguntas pessoais sobre o estado emocional; (2) Avaliação dos hábitos nutricionais; (3) Análise de sintomas da doença e de quais medicamentos estão sendo utilizados nos últimos 3 meses. Para responder aos questionários, você irá ceder cerca de 30 minutos de seu tempo, para isso será aproveitado o período de espera pela consulta, sem correr o risco de perder sua vez. Por fim, será solicitada a coleta de amostra de fezes para analisar as bactérias que fazem bem ao seu intestino.

Ao iniciar o estudo, você responderá às perguntas sobre seus sentimentos, aspectos gerais sobre hábitos alimentares e sobre as suas atividades diárias. Você será orientado sobre como deverá fazer a coleta de amostra fecal e receberá um pote para coleta, juntamente com um guia explicativo para lhe orientar. A coleta dessa amostra só será realizada uma única vez.

**Lembramos que você tem a liberdade de se recusar a participar e pode ainda deixar de responder à qualquer questionário, sem nenhum prejuízo ao seu tratamento clínico usual. Além disso, ainda tem o direito de ficar com uma das vias do termo de consentimento.**

**3. RISCOS:** Não há riscos conhecidos relativos à sua participação no estudo. Pode ser que você ache algumas perguntas muito pessoais. Se isso ocorrer, você não terá que respondê-las. Se o questionário despertar emoções negativas, você poderá interromper a entrevista a qualquer momento. Lembrando que os procedimentos realizados nesta pesquisa seguem as normas estabelecidas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que orienta os estudos com seres humanos.

**4. BENEFÍCIOS:** Ao participar desta pesquisa você não deverá ter nenhum benefício direto. Entretanto, os possíveis benefícios que você terá com a pesquisa é proporcionar a realização de um estudo que traga mais explicações acerca da influência das bactérias benéficas do intestino no desenvolvimento da Síndrome Mielodisplásica e na depressão. Os achados durante o estudo servirão de base para possíveis programas de tratamento inovadores, que possibilitem a melhoria na qualidade de vida desse grupo de pacientes.

**5. PAGAMENTO:** Você não terá nenhum tipo de despesa por participar desta pesquisa, e nada será pago por sua participação. Entretanto, se você desejar, poderá ter acesso a cópias dos relatórios da pesquisa contendo os resultados do estudo. Para tanto, entre em contato com o pesquisador responsável no endereço abaixo.

**Endereço do responsável pela pesquisa:**

**Nome:** Giovanna Riello Barbosa Correia

**Instituição:** Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos – NPDM

**Endereço:** Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo

**Telefone do Coordenador de Pesquisa:** 3366-8036

**ATENÇÃO:** Para Informações sobre sua participação na Pesquisa, dirija-se ao:  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFC

**6. CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA:** Todas as informações coletadas neste estudo serão estritamente confidenciais. Apenas os membros do grupo de pesquisa terão conhecimento das respostas, seu nome não será mencionado em nenhum

momento. Todos os dados serão analisados em conjunto, garantindo o **caráter anônimo** das informações. Os resultados poderão ser utilizados em eventos e publicações científicas, sempre resguardando sua identidade.

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu **DOU O MEU CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO COMO SUJEITO**

CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Nome do membro da equipe de pesquisa: \_\_\_\_\_

Local e Data: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do membro da equipe de pesquisa:

\_\_\_\_\_

Coordenador do Projeto

\_\_\_\_\_

Profª. Dra. Danielle Macêdo Gaspar



## APÊNDICE II - EXCERTO DA TABELA DE METADADOS: CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES.

SampleID	SMD	EPREX	Depressão	Classificação SMD	SMD Risco	Cariótipo	Dependência	Hemoglobina2	Hemoglobina	Plaquetas	IPSS	Gordura_corporal	Gordura_corporal2	Fumante	Etilista
C32	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	NA	NA	NA	NA
C33	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	NA	NA	NA	NA
C34	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	30,88255588	25 - 35%	Fumante	Não etilista
C35	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	21,47197293	25%	Fumante	Não etilista
C36	Controle	Não	Sim	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	37,66910041	35%	Não fumante	Não etilista
C37	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	29,64437673	25 - 35%	Não fumante	Não etilista
C38	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	23,54782998	25%	Fumante	Etilista
C39	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	35,02424642	35%	Não fumante	Não etilista
C40	Controle	Não	Sim	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	28,67144045	25 - 35%	Não fumante	Não etilista
C41	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	35,36547482	35%	Fumante	Não etilista
C42	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	34,2552955	25 - 35%	Fumante	Etilista
C43	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	33,14724723	25 - 35%	Não fumante	Não etilista
C44	Controle	Não	Sim	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	33,13342685	25 - 35%	Não fumante	Etilista
C45	Controle	Não	Sim	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	35,3050593	35%	Não fumante	Não etilista
C46	Controle	Não	Não	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	29,67866518	25 - 35%	Fumante	Não etilista
C47	Controle	Não	Sim	Controle	Controle	Controle	Não	NA	NA	NA	Controle	29,67866518	25 - 35%	Não fumante	Não etilista
SMD1	SMD	Sim	Sim	AREB	Alto	Alterado	Sim	10,3	> 10	>100.000	Baixo risco	36,36519468	35%	Não fumante	Não etilista
SMD2	SMD	Sim	Não	ARSA	Baixo	Normal	Não	8,6	8 - 10	50.000 - 100.000	Intermediário	46,5439959	35%	Fumante	Etilista
SMD3	SMD	Sim	Não	CRDM	Intermediário	Alterado	Sim	7,5	< 8	>100.000	Intermediário	42,55883895	35%	Fumante	Não etilista
SMD4	SMD	Não	Sim	CRDM	Intermediário	Alterado	Não	12,7	> 10	50.000 - 100.000	Baixo risco	46,51251408	35%	Fumante	Não etilista
SMD5	SMD	Não	Não	CRDM	Intermediário	NA	Não	13,3	> 10	< 50.000	Baixo risco	NA	NA	NA	NA
SMD6	SMD	Não	Sim	AREB	Alto	Alterado	Não	6,1	< 8	< 50.000	Alto risco	18,24203647	25%	Fumante	Não etilista

SampleID	SMD	EPREX	Depressão	Classificação SMD	SMD Risco	Cariótipo	Dependência	Hemoglobina2	Hemoglobina	Plaquetas	IPSS	Gordura corporal	Gordura corporal2	Fumante	Etilista
SMD7	SMD	Não	Não	CRDM	Intermediário	Alterado	Não	6,3	< 8	>100.000	Alto risco	44,41632358	35%	Não fumante	Não etilista
SMD8	SMD	Sim	Sim	AR	Baixo	Normal	Não	4,2	< 8	>100.000	Alto risco	38,20988004	35%	Não fumante	Não etilista
SMD9	SMD	Sim	Não	AR	Baixo	Normal	Não	6,8	< 8	< 50.000	Intermediário	NA	NA	NA	NA
SMD10	SMD	Sim	Não	CRDM	Intermediário	Normal	Sim	6,9	< 8	>100.000	Alto risco	23,92187997	25%	Fumante	Etilista
SMD11	SMD	Sim	Sim	AREB	Alto	Alterado	Não	9,6	8 - 10	>100.000	Baixo risco	41,99786609	35%	Não fumante	Não etilista
SMD12	SMD	Não	Não	ARSA	Baixo	Alterado	Não	11,6	> 10	< 50.000	Intermediário	36,3599587	35%	Não fumante	Etilista
SMD13	SMD	Sim	Não	AREB	Alto	Alterado	Sim	6,8	< 8	< 50.000	Alto risco	24,85450686	25%	Fumante	Etilista
SMD14	SMD	Não	Sim	CRDM	Intermediário	Normal	Sim	9,5	8 - 10	50.000 - 100.000	Baixo risco	46,82435651	35%	Fumante	Não etilista
SMD15	SMD	Não	Não	SMD-RT	Intermediário	Normal	Não	11,9	> 10	< 50.000	Baixo risco	24,5260705	25%	Não fumante	Etilista
SMD16	SMD	Sim	Sim	CRDM	Intermediário	Alterado	Não	8,5	8 - 10	>100.000	Baixo risco	44,39207717	35%	Não fumante	Não etilista
SMD17	SMD	Sim	Sim	CRDM	Intermediário	Normal	Não	8,6	8 - 10	< 50.000	Intermediário	24,5260705	25%	Fumante	Não etilista
SMD18	SMD	Sim	Não	ARSA	Baixo	Alterado	Não	10,4	> 10	>100.000	Baixo risco	NA	NA	NA	NA
SMD19	SMD	Sim	Sim	CRDM	Intermediário	Normal	Não	10,7	> 10	50.000 - 100.000	Baixo risco	37,2876828	35%	Fumante	Não etilista
SMD20	SMD	Não	Não	AR	Baixo	Alterado	Não	NA	NA	>100.000	Alto risco	NA	NA	NA	NA
SMD21	SMD	Sim	Não	ARSA	Baixo	Normal	Não	9,6	8 - 10	50.000 - 100.000	Baixo risco	34,72768085	25 - 35%	Não fumante	Não etilista
SMD22	SMD	Sim	Sim	ARSA	Baixo	Normal	Não	9,75	8 - 10	50.000 - 100.000	Baixo risco	44,60886434	35%	Não fumante	Não etilista
SMD23	SMD	Sim	Sim	AREB	Alto	Alterado	Sim	6,9	< 8	>100.000	Alto risco	42,26703158	35%	Não fumante	Não etilista
SMD24	SMD	Sim	Sim	ARSA	Baixo	Normal	Não	9,8	8 - 10	>100.000	Baixo risco	40,20385235	35%	Fumante	Etilista
SMD25	SMD	X	Não	AREB	Alto	Alterado	Sim	7	< 8	< 50.000	Alto risco	36,34399781	35%	Não fumante	Etilista
SMD26	SMD	Não	Sim	SMD-RT	Intermediário	Alterado	Não	8,98	8 - 10	50.000 - 100.000	Baixo risco	30,78693638	25 - 35%	Fumante	Etilista
SMD27	SMD	Não	Não	AREB	Alto	Alterado	Não	12,8	> 10	>100.000	Alto risco	24,57341334	25%	Fumante	Etilista
SMD28	SMD	Sim	Não	ARSA	Baixo	Alterado	Não	8,6	8 - 10	>100.000	Baixo risco	25,44680732	25 - 35%	Não fumante	Não etilista
SMD29	SMD	Sim	Não	ARSA	Baixo	Normal	Não	7,9	< 8	>100.000	Baixo risco	17,43794224	25%	Fumante	Etilista
SMD30	SMD	Sim	Sim	ARSA	Baixo	Alterado	Não	8,7	8 - 10	>100.000	Baixo risco	37,54339737	35%	Fumante	Não etilista