

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**METAGENOMA MICROBIÓTICO COMO FATOR MODIFICADOR DA  
HETEROGENEIDADE CLÍNICA DA HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA**

GUSTAVO MOTTIN RIZOWY

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**METAGENOMA MICROBIÓTICO COMO FATOR MODIFICADOR DA  
HETEROGENEIDADE CLÍNICA DA HOMOCISTINÚRIA CLÁSSICA**

GUSTAVO MOTTIN RIZOWY

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sandra Leistner-Segal

Co-orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ida Vanessa  
Doederlein Schwartz

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção de Mestre em Medicina:  
Ciências Médicas, da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Programa de  
PósGraduação em Medicina: Ciências  
Médicas.

Porto Alegre

2018

*Epígrafe:*

*“Sempre é difícil nascer. A ave tem de sofrer para sair do ovo, isso você já sabe. Mas volte o olhar para trás e pergunte a si mesmo se foi de fato tão penoso o caminho. Difícil, apenas? Não terá sido belo também? Podia imaginar outro tão belo e tão fácil?”*

(Hermann Hesse)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, quero agradecer às professoras Sandra Leistner-Segal e Ida Vanessa Doederlein Schwartz pela oportunidade, acolhimento, confiança, ensinamentos, dedicação e disposição para a realização deste trabalho.

Quero agradecer também ao professor Luis Fernando Wurdig Roesch pela colaboração neste trabalho mesmo estando muito longe.

Um agradecimento muito especial à Soraia Poloni, Karina Colonetti e Karina Donis que me acompanharam e me ajudaram muito para a realização deste trabalho.

Agradeço também a todos os colegas que me ajudaram de forma direta ou indiretamente neste trabalho, especialmente aos colegas do LGM, BRAIN e CIP-Biotec.

Quero agradecer aos meus pais, Víctor Hugo e Rosa Maria, por todo apoio e companhia ao longo dessa trajetória e em especial a minha namorada e companheira Nathalia por ter sempre me apoiado e estado ao meu lado.

Agradeço ao Serviço de Genética Médica do HCPA e à UFRGS por viabilizar a realização deste trabalho

Agradeço aos pacientes com homocistinúria clássica e aos seus familiares pela colaboração e interesse em participar do estudo.

Obrigado a todos!

## RESUMO

**Introdução:** A Homocistinúria Clássica, é um erro inato do metabolismo, caracterizado pela deficiência da enzima Cistationina  $\beta$ -sintase. A Homocistinúria Clássica, é uma doença autossômica recessiva que apresenta uma ampla heterogeneidade clínica, infelizmente ainda não há uma explicação sobre a variabilidade encontrada nos pacientes. Acredita-se que há contribuição da variação do perfil da microbiota intestinal tanto nos tipos e nas gravidades das manifestações clínicas, quanto às respostas ao tratamento, supondo então uma influência da microbiota intestinal na variabilidade clínica **Objetivo:** Caracterizar, por meio de sequenciamento de nova geração, a microbiota intestinal de uma amostra de pacientes com Homocistinúria Clássica. **Métodos:** Foi realizado o sequenciamento da região V4 do gene 16SrRNA extraído de amostra de fezes de pacientes com Homocistinúria Clássica (n=8). Foram realizadas análise de composição microbiana (alfa-diversidade, beta-diversidade e LEfSe), além disso, foi realizada uma revisão dos prontuários dos pacientes, aplicação de um questionário clínico-nutricional, registro alimentar de 3 dias e recordatório de 24 horas. Os resultados dos pacientes foram comparados à um grupo controle (n=8) pareado por sexo e idade. **Resultados:** A abundância entre os filos bacterianos foi similares entre os grupos, tendo o filo Bacteroidetes como o mais abundante (HCU=60%; Controle=54%), seguido de Firmicutes (HCU=35%; Controle=41%) e Proteobacteria (HCU=3%; Controle=3%). A análise da alfa-diversidade mostrou que houve um aumento na riqueza das comunidades bacterianas (Chao1 e ACE, p=0.049), também houve uma diferença estatística na beta-diversidade (PERMANOVA, p<0.002; ANOSIM, p<0.01). A análise nutricional mostrou que a ingesta diária de gordura (p=0.001), gordura saturada (p=0.001), gordura monoinsaturada (p=0.003), colesterol (p=0.001), vitamina D (p=0.001) e selênio (p=0.027) foram menores nos pacientes do que nos controles, estes resultados foram esperados devido ao tratamento dietético. Além disso, o tratamento com a betaína (p=0.007), folato (p=0.001) e piridoxina (p=0.001) foram estatisticamente significativos. Quanto às manifestações clínicas, verificou-se que as manifestações oculares (p=0.001), esqueléticas (p=0.003) e do sistema nervoso central (p=0.003) tiveram resultados estatisticamente significativas. **Conclusão:** Os resultados mostram que houve um aumento na alfa-diversidade nos pacientes caracterizando um aumento da riqueza bacteriana, mas mantendo a uniformidade. Sugere-se que as manifestações clínicas e o tratamento tenham um papel importante sobre o microbioma, principalmente pela suplementação de vitaminas do complexo B desempenha um papel de modulador na microbiota.

**Palavras-chave:** Homocistinúria Clássica. Microbioma Intestinal. Metagenômica. Sequenciamento de Nova Geração.

## ABSTRACT

**Introduction:** Classical homocystinuria, is an inborn error of metabolism, characterized by deficiency of the enzyme Cystathionine  $\beta$ -synthase. Classical Homocystinuria is an autosomal recessive disease with wide clinical heterogeneity, unfortunately there is still no explanation for this variability. It is believed that there is a contribution of the gut microbiota profile regarding the type and the severity of the clinical manifestations, as well as the responses to treatment. **Aim:** To characterize the gut microbiota from a sample of patients with Classical Homocystinuria by next generation sequencing. **Methods:** Sequencing of the V4 region of the 16SrRNA gene was performed from stool samples of patients with Classical Homocystinuria (n=8). A microbial composition analysis (alpha-diversity, beta-diversity and LEfSe) was performed. In addition, patient's medical records were reviewed. A clinical-nutritional questionnaire was applied, consisting of a 3-days food diary and a 24-hour recall. Patient results were compared to control group (n=8) paired by sex and age. **Results:** The abundance between the bacterial phyla was similar between the groups, the Bacteroidetes was the most abundant (HCU=60; Control=54%), followed by Firmicutes (HCU=35%; Control=41%) and Proteobacteria (HCU=3%; Control=3%). The analysis of alpha-diversity showed an increase in richness of bacterial communities in patients (Chao1 e ACE,  $p=0.049$ ), there was also a statistical difference in beta-diversity (PERMANOVA,  $p<0.002$ ; ANOSIM,  $p<0.01$ ). Nutritional analysis showed that the daily intake of fat ( $p=0.001$ ), saturated fat ( $p=0.001$ ), monounsaturated fat ( $p=0.003$ ), cholesterol ( $p=0.001$ ), vitamin D ( $p=0.001$ ) and selenium ( $p=0.027$ ) were lower in the patients than in the control group, these results were expected due to dietary treatment. Besides that, being treated with betaine ( $p=0.007$ ), folate ( $p=0.001$ ) and pyridoxine ( $p=0.001$ ) were statistically significant. As to the clinical manifestations, eye ( $p=0.001$ ), skeleton ( $p=0.003$ ) and CNS ( $p=0.003$ ) had statistically significant results. **Conclusion:** The results showed an increase in alpha-diversity in patients characterizing an increase in bacterial richness, nevertheless, evenness was maintained. We suggest that clinical manifestations and treatment have an important role on the microbiome, mainly by the supplementation of vitamins of the B complex has a role of modulator in the gut microbiota

**Key-words:** Classical Homocystinuria. Gut microbiota. Metagenomic. Next Generation Sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo .....	13
Figura 2 - Esquema do Marco Teórico.....	19
Figure 1 - Frequencies of most abundant phyla in HCY and Control groups .....	35
Figure 2 - Frequencies of most abundant phyla per sample .....	35
Figure 3 - Alpha-diversity measurements of microbial communities in HCY and Control groups .....	36
Figure 4 - Beta-diversity .....	37



## LISTA DE TABELAS

Table 1 - Sample characterization .....	32
Table 2 - Comparison of daily intake between classical homocystinuria and control groups .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Table 3 - Bacterial phylotypes presents in HCY and Control groups .....	37

## LISTA DE SIGLAS

C $\beta$ S	Cistationina $\beta$ -sintase
CIP-Biotec	Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biot
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleicos Fosfatados
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
HCU	Homocistinúria Clássica
ISP	Ion Sphere™ Particles
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
OTU	Unidades Taxonômicas Operacionais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGM	Personal Genome Machine
SGM-HCPA	Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNIPAMPA	Universidade Federal do Pampa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Homocistinúria Clássica.....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Manifestações clínicas .....	14
2.2.2 Tratamento.....	15
<b>2.3 Microbioma .....</b>	<b>16</b>
2.3.1 Metagenômica .....	17
<b>3 MARCO CONCEITUAL.....</b>	<b>19</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Objetivo primário .....</b>	<b>23</b>
<b>5.2 Objetivos secundários.....</b>	<b>23</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>
<b>7. ARTIGO .....</b>	<b>27</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>43</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças genéticas, na sua maioria, com herança autossômica recessiva e causadas por uma deficiência enzimática causando interrupção de diferentes vias metabólicas. Consequentemente, há um acúmulo do substrato desta enzima e uma redução de seu produto. As vias metabólicas envolvidas nos EIM também estão envolvidas em doenças multifatoriais mais prevalentes, logo há um compartilhamento de manifestações clínicas e provavelmente de fisiopatogênese entre essas doenças, tendo como exemplo os pacientes com Homocistinúria Clássica (HCU; OMIM +236200), causada pela deficiência da enzima Cistationina  $\beta$ -Sintase (C $\beta$ S; EC 4.2.1.22) que apresentam maior prevalência de fenômenos tromboembólicos, distúrbios neuropsiquiátricos e fenótipo “magro”. (Saínz *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2017; Blau, 2006).

A quantidade de tratamentos para os EIM aumentou consideravelmente nos últimos anos, muito em decorrência de políticas específicas para o desenvolvimento de medicamentos para doenças raras. As estratégias de tratamento são diversas e dependem das vias metabólicas e dos tipos celulares mais afetados, e em grande parte envolvem intervenções dietéticas. Como resultado, há muitas diferenças à nível individual nas respostas aos tratamentos e nos desenvolvimentos dos efeitos colaterais. Essas diferenças ainda são pouco relatadas na literatura. Para os EIM cujos substratos são moléculas menores, as manifestações clínicas iniciam logo após o início do aleitamento e o tratamento instituído antes do início da sintomatologia, impede o desenvolvimento destas manifestações. (Scriver *et al.*, 2001).

A microbiota intestinal é descrita como um novo órgão que surgiu durante o Século XX. É caracterizada por ter diversas funções com relação ao ser humano, como uma consequência de suas bilhões de bactérias que habitam o trato gastrointestinal. Com mais de 1500 espécies, totalizando mais de 4 milhões de genes, proporcionam um grupo ecológico mutualístico, devido à interação do microbioma com o hospedeiro. Esta relação com o hospedeiro pode ser modificada pelo estresse nutricional; além disso, doenças como a obesidade e o diabetes podem ser provocadas pela variação da microbiota intestinal. A possível relação direta entre a microbiota intestinal e o hospedeiro, abriram novas oportunidades terapêuticas e nutricionais. (Burcelin *et al.*, 2013)

Os antibióticos e os padrões alimentares são fatores conhecidos por modificar a composição da microbiota intestinal. Os subprodutos do metabolismo da microbiota intestinal atuam sobre o metabolismo alterando diretamente a função intestinal, além de agir sobre outros órgãos e tecidos (Tremaroli e Bäckhed, 2012). Mudanças na composição e na diversidade da microbiota podem resultar em um desequilíbrio favorecendo à colonização de bactérias prejudiciais ao intestino, já sendo associada a diversas doenças como a diabetes, a obesidade, as doenças inflamatórias intestinais, e desenvolvimento de manifestações neurológicas (León *et al.*, 2014; Manichanh *et al.*, 2012; Giongo *et al.*, 2010; Turnbaugh *et al.*, 2009).

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Este trabalho é focado nos aspectos relacionados ao metagenoma microbiótico como fator modificador da heterogeneidade clínica da homocistinúria clássica e como a variação no perfil da microbiota intestinal pode estar relacionada com as manifestações clínicas e as respostas aos tratamentos. A estratégia de busca envolveu à base de dados PubMed. Foram realizadas buscas através dos termos “*Intestinal Microbiota*”, “*Homocystinuria*”, “*Cystathionine Beta-Synthase*”, “*Metagenomic*” e suas combinações estão representadas na Figura 1



**Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo.** Resultado da combinação das 4 palavras-chaves utilizadas na busca de referência. Figura original.

## 2.2 Homocistinúria Clássica

A Homocistinúria Clássica (HCU) é categorizada como um erro inato do metabolismo (EIM) e está relacionada com as vias de transulfuração e remetilação da metionina proveniente da dieta. A quantidade de tratamentos disponíveis para os EIM aumentou nos últimos anos. As estratégias de tratamento são diversas e dependem das vias metabólicas afetadas, e grande parte das estratégias envolvem intervenções dietéticas, como no caso dos pacientes com HCU, que além de uma dieta com restrição de metionina, ainda necessitam de medicamentos, principalmente piridoxina e betaína; e uma fórmula metabólica para suprir os demais aminoácidos essenciais. Como resultado, há muitas diferenças à nível individual nas respostas aos tratamentos e nos desenvolvimentos dos efeitos colaterais. Essas diferenças ainda são pouco relatadas na literatura. Para os EIM cujos substratos são moléculas menores, as manifestações clínicas iniciam logo após o início do aleitamento e o tratamento instituído antes do início da sintomatologia, impede o desenvolvimento das manifestações clínicas. Entre as principais características clínicas da doença estão os problemas ósseos, oculares, tromboembólicos e neuropsiquiátrico. (Blau, 2006; Saíñz *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2017; Mudd *et al.*, 1985; Yap e Naughten, 1998).

Acredita-se que a prevalência de HCU seja amplamente subestimada. Com base em estudos de triagem neonatal, estima-se uma incidência mundial de aproximadamente 1:344000 recém nascidos, com grande variação entre populações. (Skovby *et al.*, 2010; Scriver *et al.*, 2001).

### 2.2.1 Manifestações clínicas

HCU é considerada uma doença multissistêmica, lenta e progressiva. Os sinais clínicos da doença envolvem principalmente os sistemas: ocular, vascular, nervoso central e ósseo (Mudd *et al.*, 1985). A luxação de cristalino é provavelmente o achado mais consistente da HCU, apresentando-se nos estágios iniciais da vida e presente na

grande maioria dos pacientes não-tratados (Mudd *et al.*, 1985). A doença vascular é frequente e a principal causa de morbimortalidade, sendo o tromboembolismo a principal complicação (Wilcken e Wilcken, 1997). O principal e mais frequente achado no sistema nervoso central é o retardo mental, geralmente presente como atraso de desenvolvimento nos primeiros anos de vida. (Morris *et al.*, 2017). Distúrbios psiquiátricos também são frequentes, e incluem principalmente o distúrbio de personalidade, a ansiedade e a depressão (Scriver *et al.*, 2001). Quanto ao sistema ósseo a principal complicação é a osteoporose (Mudd *et al.*, 1985).

### 2.2.2 Tratamento

O principal objetivo do tratamento da HCU é a redução nos níveis plasmáticos da homocisteína total. Três estratégias podem ser utilizadas: a estimulação da atividade residual da C $\beta$ S, a redução da sobrecarga de metionina e o aumento da remetilação de homocisteína a metionina. Além da redução de homocisteína, o tratamento deve corrigir a deficiência de cisteína quando presente e garantir o crescimento e desenvolvimento adequados. (Wilcken e Wilcken, 1997; Morris *et al.*, 2017).

A enzima C $\beta$ S utiliza como cofator a forma ativa da vitamina B6 (piridoxina). A piridoxina atua aumentando a atividade residual da enzima, o que ocasiona redução da concentração de homocisteína e metionina e aumento de cisteína. (Mudd *et al.*, 1970).

A restrição dietética de metionina é feita através da limitação do aporte de proteínas naturais. Para atingir as necessidades proteicas diárias utiliza-se um suplemento de aminoácidos, chamado de fórmula metabólica, isento de metionina e suplementado com cisteína, vitaminas, minerais e outros elementos. Além disso, um aporte energético adequado é fundamental para evitar o catabolismo proteico e promover um crescimento e desenvolvimento adequados. (Martins *et al.*, 2006; Pons *et al.*, 2004).

A má adesão à dieta é comum, principalmente em pacientes com diagnóstico tardio, uma vez que exige uma mudança drástica nos hábitos alimentares. Além disso, devido à baixa palatabilidade, a ingestão insuficiente do suplemento de aminoácidos também é frequente. Nesta situação, os níveis de homocisteína podem elevar-se rapidamente e o crescimento pode ficar prejudicado pela ingestão proteica inadequada (Walter *et al.*, 1998). Embora o uso de fórmula metabólica seja indicado a pacientes não-responsivos, uma restrição proteica moderada é recomendada para todos os pacientes (Blau, 2006).



### 2.3 Microbioma

As bactérias ocupam todas as superfícies do corpo humano e o número total de células bacterianas associadas ao corpo humano é cerca de 10 vezes maior do que o número de células humanas. Dentro desta racionalidade a microbiota gastrointestinal funciona como um “órgão virtual” evidenciando que a simbiose humanos/micróbios contribui para as características da fisiologia humana. (Kurokawa *et al.*, 2007).

A microbiota intestinal é caracterizada por suas inúmeras funções, no organismo humano, devido à sua composição de bilhões de bactérias que habitam de forma harmônica o lúmen e a mucosa do epitélio intestinal. A simbiose entre o hospedeiro e a microbiota intestinal para o controle da homeostase energética, pode ser modificada pelo estresse nutricional. Supõe-se que a pandemia da diabetes e da obesidade, não é provocada apenas pela variação do genoma humano, mas também pela variação no metagenoma microbiótico intestinal. A microbiota intestinal é herdada a partir da mãe e do ambiente durante o nascimento. A correspondente diversidade, a rápida evolução da expressão gênica, a sua influência no metabolismo e a descoberta recente da existência de uma microbiota tecidual dentro do hospedeiro abriram novas oportunidades terapêuticas e nutricionais, assim como a identificação precisa de biomarcadores. (Burcelin *et al.*, 2013).

Os antibióticos e as dietas alimentares são fatores conhecidos por modular a composição da microbiota intestinal em seres humanos. Os subprodutos do metabolismo da microbiota intestinal atuam sobre o metabolismo alterando diretamente a função intestinal, além de agir sobre o fígado, o cérebro, e sobre o tecido adiposo e muscular (Tremaroli e Bäckhed, 2012). Mudanças na composição e na diversidade da microbiota podem resultar em um desequilíbrio favorecendo a colonização de bactérias prejudiciais à saúde no intestino, resultando na disbiose, que já foi associada à autoimunidade na diabetes tipo 1, à obesidade, às doenças inflamatórias intestinais, e ao desenvolvimento de manifestações neurológicas (Arrieta *et al.*, 2014; León *et al.*, 2014; Manichanh *et al.*, 2012; Giongo *et al.*, 2010; Turnbaugh *et al.*, 2009). Achados sugerem que a disbiose possa estar relacionada com as modificações no perfil de citocinas plasmáticas, já que os diferentes tipos de dieta estão associados à diferentes perfis de marcadores inflamatórios. (Kong *et al.*, 2014). Além disso, um dos papéis chaves desempenhados pela microbiota intestinal, é na estimulação e na promoção da maturação do sistema imune, conferindo resistência à patógenos (Martín *et al.*, 2014).

### 2.3.1 Metagenômica

A metagenômica microbiana é definida como o sequenciamento e a análise do DNA de microrganismos proveniente de amostras do ambiente sem a necessidade do cultivo. À medida que aumentaram as atenções envolvendo à compreensão do ser humano como um organismo onde há a interação microbiana com suas células, a ecologia microbiana tem ganhado destaque e a metagenômica tem sido aplicada para a detecção de populações de microrganismos. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), expandiu-se uma nova perspectiva sobre as abordagens científicas na pesquisa básica, aplicada e clínica. O avanço da tecnologia com a sua disponibilidade no mercado, eliminou a necessidade de clonar fragmentos de DNA de bactérias, além de aumentar a capacidade de produzir uma enorme quantidade de dados. (Group *et al.*, 2009; Marchesi *et al.*, 2016; Proctor, 2016).

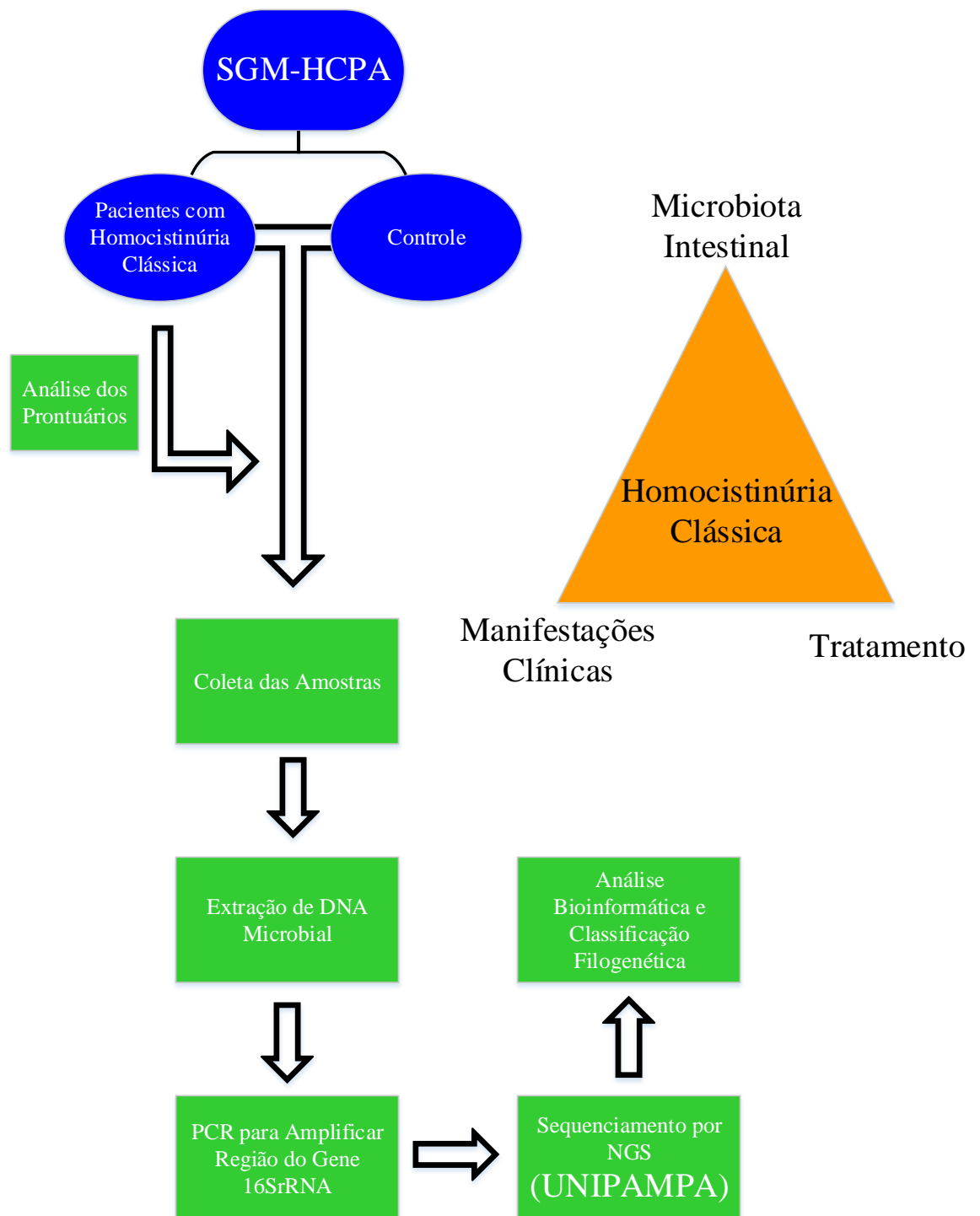
As diversas metodologias do NGS podem ser aplicadas para identificar e comparar as comunidades microbianas. Dentre os métodos está o sequenciamento de um gene marcador, sendo o gene 16SrRNA o mais utilizado. O gene 16SrRNA permite uma rápida catalogação da composição bacteriana das amostras clínicas provenientes de pacientes, podendo ser utilizadas desde atribuições taxonômicas até o gênero e espécie. Este método consiste em extrair o DNA microbiano a partir da amostra; realizar as reações de PCR para amplificar a região específica do gene 16SrRNA e finalmente utilizar este conjunto de amplificações para o sequenciamento. (Group *et al.*, 2009; Proctor, 2016).

A avaliação da comunidade microbiana por meio de técnicas de NGS tem expandido o poder de acesso à estes organismos, sendo a porção menor do DNA ribossomal – 16SrRNA – tipicamente sequenciada para a avaliação das comunidades de Bactérias e Arqueas. Comparado com outros genes, o gene 16SrRNA tem inúmeras vantagens quando se trata de análises da comunidade microbiana, pois possui regiões conservadas que permitem o anelamento de iniciadores para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); além das regiões do gene serem suficientemente variáveis para permitir uma precisa identificação taxonômica e filogenética dos membros da comunidade; e uma vez que este gene for amplamente sequenciado em pesquisas de diversidade microbiana, haverá uma ampla quantidade de sequências do 16SrRNA nos bancos de dados permitindo uma identificação taxonômica mais precisa. (Group *et al.*, 2009; Proctor, 2016, Tran *et al.*, 2017; Weiss *et al.*, 2017).

O gene ribossomal 16SrRNA tem sido utilizado como ferramenta para a classificação filogenética de bactérias (Pace, 1997) e para a definição de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) baseada na similaridade entre as sequências (Schloss e Handelsman, 2006). A utilização desta técnica permitiu uma análise mais detalhada sobre a identidade e a abundância dos microrganismos avaliados. Foram desenvolvidos sistemas de sequenciamento em larga escala, permitindo a diminuição dos custos por base sequenciada e permitindo o sequenciamento de múltiplas amostras de forma independente, em larga escala, por meio da aplicação de um sistema de código de barras (barcode) (Hamady *et al.*, 2008). Além disso, foi desenvolvida uma nova tecnologia de sequenciamento em larga escala com base na determinação de íons hidrogênio liberados pela atividade da DNA polimerase, com a utilização de um microchip denominado Ion Torrent™. A bioquímica simples é base desta técnica, pelo fato de utilizar apenas a DNA polimerase e os nucleotídeos que são adicionados um a um na reação. O processo de detecção é igualmente simples, quando um nucleotídeo complementar à sequência de DNA é incorporado, são liberados íons hidrogênios, alterando o pH da solução, e os íons são detectados por nano-sensores na superfície de um semicondutor. Assim, a informação bioquímica é transformada em informação digital. O sistema utiliza chips com diferentes capacidades que podem produzir de 10Mb até 1 Gb de informação e permite que as técnicas de códigos de barras desenvolvidas para a plataforma 454 possam ser aplicadas, resultando em projetos menos custosos e mais passíveis de serem realizados em menor tempo (Merriman *et al.*, 2012).

Os avanços na ciência e na tecnologia estão permitindo a revisão e a re-orientação das metodologias, permitindo que questões antigas e atuais sejam abordadas através de novas óticas. Recentes avanços em procedimentos de extração de biomoléculas, NGS, metagenômica, metatranscriptômica e todas as outras “ômicas” têm permitido a análise comparativa da abundância, diversidade e de importantes genes funcionais das comunidades microbianas inteiras o que acaba gerando uma grande quantidade de dados e de descobertas. Diante disso, destaca-se que esta é uma grande oportunidade para estudar o microbioma humano brasileiro utilizando as técnicas moleculares e plataformas de última geração, juntamente com análises já tradicionais. (Group *et al.*, 2009; Proctor, 2016).

## 3 MARCO CONCEITUAL



**Figura 2. Esquema do Marco Teórico.** Descrição da relação das informações apresentadas no esquema: caracterizar a microbiota intestinal de pacientes com homocistinúria clássica e analisar a relação da variação no perfil da microbiota intestinal tanto com as manifestações clínicas, quanto com as respostas aos tratamentos. Esta caracterização

se deu com a coleta de amostras fecais de pacientes diagnosticados com homocistinúria clássica e amostras controles, sendo que os pacientes foram recrutados a partir do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). Foi realizado a análise dos prontuários destes pacientes. A extração das amostras de DNA Microbial, a realização da técnica de PCR para amplificar a Região do Gene 16SrRNA e as Análises de Bioinformática e Classificação Filogenética foram realizadas no SGM-HCPA e a técnica de NGS foi realizada na UNIPAMPA. Figura original.

#### 4 JUSTIFICATIVA

A biomassa microbiana corresponde a aproximadamente 50% de toda a biomassa da Terra e estima-se que apenas 1% dos microrganismos sejam patogênicos (Sleator, 2010). As bactérias ocupam todas as superfícies do corpo humano e o número total de células bacterianas associadas ao corpo humano é cerca de 10x maior do que o número de células humanas. Isso faz do ser humano essencialmente mais micróbio do que humano (Kurokawa *et al.*, 2007). Dentro desta racionalidade a microbiota gastrointestinal funciona como um “órgão virtual” evidenciando que a simbiose humanos/micróbios define as características da fisiologia humana.

Os avanços na ciência e na tecnologia estão permitindo a revisão e a re-orientação das metodologias, permitindo que questões antigas e atuais sejam abordadas através de novas óticas. Recentes avanços em procedimentos de extração de biomoléculas, NGS, metagenômica, metatranscriptômica e todas as outras “ômicas” têm permitido a análise comparativa da abundância, diversidade e de importantes genes funcionais das comunidades microbianas inteiras o que acaba gerando uma grande quantidade de dados e de descobertas. Diante disso, destaca-se que esta é uma grande oportunidade para estudar o microbioma humano brasileiro utilizando as técnicas moleculares e plataformas de última geração, juntamente com análises já tradicionais.

O desenvolvimento da pesquisa translacional, que tem como foco principal a troca de conhecimentos entre a ciência básica e a clínica, direciona os achados da pesquisa básica para os pacientes e proporciona a utilização de novas tecnologias que podem ser aplicadas, por exemplo, ao tratamento dos EIM. Mesmo que o tratamento dessas doenças seja em alguns casos eficazes, ainda há muitos fatores que diminuem a sua eficiência, como, a baixa adesão ao tratamento, no caso da Homicistinúria Clássica, além da ocorrência de efeitos colaterais.

A grande variabilidade clínica relacionada com os EIM ainda não é bem compreendida. Dessa forma, a análise da microbiota intestinal através do NGS pode fornecer novas visões quanto à resposta ao tratamento e à evolução clínica desses pacientes, que resultará em medidas terapêuticas mais adequadas e benéficas. Isto pode ser considerado estratégico para o SUS, uma vez que o tratamento dos EIM é geralmente de alto custo.

Com base na publicação da Política Integral para portadores de Doença Raras, a Homicistinúria Clássica deve ser uma das doenças cujo tratamento poderá ser coberto

pelo SUS em um curto espaço de tempo. Nesse contexto, a microbiota intestinal emerge como um possível fator modificador das manifestações clínicas e da resposta ao tratamento dos EIM, havendo pouquíssimos estudos na literatura a respeito. A estimativa adequada da comunidade microbiana representa o primeiro passo para o entendimento da relação entre microrganismos e hospedeiros. A partir disso, compreender mais efetivamente as relações e funções desempenhadas neste sistema.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo primário**

Caracterizar, por meio de sequenciamento de nova geração (NGS), a microbiota intestinal de uma amostra de pacientes com Homocistinúria Clássica em tratamento.

### **5.2 Objetivos secundários**

- a) caracterizar a composição da microbiota intestinal de pacientes com Homocistinúria Clássica, em tratamento, e compará-la a de indivíduos controle;
- b) avaliar a relação entre o tipo de tratamento utilizado e a composição da microbiota intestinal de pacientes com Homocistinúria Clássica;
- c) verificar as possíveis associações do perfil gênico da microbiota intestinal de pacientes com Homocistinúria Clássica em tratamento com os níveis plasmáticos de Homocisteína;
- d) investigar as possíveis associações entre o perfil gênico da microbiota intestinal e os desfechos clínicos dos pacientes com Homocistinúria Clássica em tratamento;
- e) analisar a relação entre o perfil alimentar e a composição da microbiota intestinal de pacientes com Homocistinúria Clássica, e comparar com indivíduos controles.



## 6 REFERÊNCIAS

BLAU, N. et al. **Physician's guide to the treatment and follow-up of metabolic diseases**. Heidelberg: Springer, 2006.

BURCELIN, R. et al. Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Oxford, v. 15, suppl. 3, p. 61–70, Sep 2013.

GIONGO, A. et al. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. **The ISME journal**, London, v. 5, n. 1, p. 82–91, Jan 2011.

GROUP, N.H.W. et al. The NIH Human Microbiome Project. **Genome Research**, New York, v. 19, n. 12, p. 2317-2323, Dec 2009.

HAMADY, M. et al. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 3, p. 235–237, Mar 2008.

KONG, L.C. et al. Dietary patterns differently associate with inflammation and gut microbes in overweight and obese subjects. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, e. 109434. Oct 20 2014.

KUROKAWA, K. et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. **DNA Research**, Tokyo, v. 14, n. 4, p. 169–181. Aug 31 2007.

LEÓN, M.E.M et al. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. **Scientific reports**, London, v. 4, e. 3814, Jan 22 2014.

MANICHANH, C. et al.. The gut microbiota in IBD. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 9, n. 10, p. 599-608. Oct 2012.

MARCHESI, J.R. et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. **Gut**, London, v. 65, n. 2, p. 330-339, Feb 2016.

MARTÍN, R. et al. The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease, **Virulence**, Austin, v. 5, n. 3, p. 413-423, Apr 1 2014.

MARTINS, A.M. et al. **Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo**. São Paulo: Segmento Farma; 2006.

MERRIMAN, B. et al. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 33, n. 23, p. 3397-3417, Dec 2012.

MORRIS, A.A. et al. Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency, **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Lancaster, v. 40, n. 1, p. 49-74, Jan 2017.

MUDD, S.H. et al. Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: the effect of pyridoxine, **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 49, n. 9, p. 1762-1773, Sep 1970.

MUDD, S.H. et al. The Natural History of Homocystinuria Due to Cystathionine B-Synthase Deficiency. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 37, n. 1, p. 1-31, Jan 1985.

PACE, N.A. Molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, New York, v. 274, n. 5313, p.734-740. May 2 1997.

PONS, M.R. et al. **Tratamiento Nutricional de los Errores Innatos del Metabolismo**. Madrid: Majadahonda, 2004.

PROCTOR, L.M. The National Institutes of Health Human Microbiome Project. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 368-372, Dec 2016.

SAÍNZ C. M. et al. Errores innatos del metabolismo: Enfermedades lisosomales. **Revista Cubana de Pediatría**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 68-76, 2002.

SCRIVER, C.R. et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 2001

SKOVBY, F. et al. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 99, n. 1, p. 1-3, Jan 2010.

SLEATOR, R.D. The human superorganism - of microbes and men. **Medical Hypotheses**, New York, v. 74,n. 2, p. 214-215, Feb 2010.

TRAN, Q. et al. Using 16S rRNA gene as marker to detect unknown bacteria in microbial communities. **BMC Bioinformatics**, London, v. 18, suppl. 14, p. 155-169, Dec 28 2017.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, London, v. 489, n. 7415, p. 242–249, Sep 13 2012.

TURNBAUGH, P.J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, London, v. 457, n. 7228, p. 480-484, Jan 22 2009

WALTER, J.H. et al. Strategies for the treatment of cystathionine beta-synthase deficiency: the experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30 years. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 157, suppl. 2, p. 71-76, Apr 1998.

WEISS, S. et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, London, v. 5, n. 1, p. 1-18, Mar 3 2017.

WILCKEN, D.E.; WILCKEN, B. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effect of treatment. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Lancaster v.20, n. 2, p. 295-300, Jun 1997.

YAP, S.; NAUGHTEN, E. Homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Lancaster, v. 21, n. 7, p. 738-747, Oct 1998.

**7. ARTIGO**











Table 1. Sample characterization			
Variable	HCY (n=8)	Control (n=8)	<i>p</i> -value
Sex (male:female)	6:2	6:2	1.000
Age (years)	28.75 ± 5.33	29.37 ± 5.08	0.874
Weight (kg)	61.70 ± 5.65	63.94 ± 7.82	0.562
Height (cm)	166.11 ± 7.81	166.16 ± 8.54	0.746
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.18 ± 0.85	22.20 ± 1.53	0.772
Consanguinity (yes:no)	4:3	0:8	<b>0.025</b>
Fecal pH	7.13 ± 0.16	7.45 ± 0.17	0.293
Antibiotic (yes:no)	3:5	1:7	0.569
Probiotic (yes:no)	0:8	2:6	0.466
Clinical features			
- Eye (yes:no)	8:0	0:8	<b>0.001</b>
- Skeleton (yes:no)	5:1	0:8	<b>0.003</b>
- CNS (yes:no)	5:1	0:8	<b>0.003</b>
- Vascular (yes:no)	3:5	0:8	0.200

Table 1. Sample characterization			
Variable	HCY (n=8)	Control (n=8)	<i>p</i> -value
Treatment			
- Formula (yes:no)	4:4	0:8	0.076
- Betaine (yes:no)	6:2	0:8	<b>0.007</b>
- Vitamin B <sub>12</sub> (yes:no)	3:5	0:8	0.200
- Folate (yes:no)	7:1	0:8	<b>0.001</b>
- Pyridoxine (yes:no)	7:1	0:8	<b>0.001</b>
HCY, classical homocystinuria Numerical variables were summarized as means $\pm$ SEM and compares using Mann-Whitney <i>U</i> test. Categorical variables were compared using Fisher's exact test. Significant <i>p</i> -values (<0.05) highlighted in bold.			

Table 2. Comparison of daily intake between classical homocystinuria and control groups			
Nutrient	HCY (n=8)	Control (n=7)	<i>p</i> -value
General			
- Calories (kcal)	1391.04 $\pm$ 163.22	1869.33 $\pm$ 261.24	0.164
- Protein (g)	55.28 $\pm$ 12.22	100.42 $\pm$ 24.94	0.105
- Protein/Weight (g/kg)	0.89 $\pm$ 0.16	1.71 $\pm$ 0.41	0.082
- Carbohydrates (g)	227.30 $\pm$ 31.71	207.99 $\pm$ 25.89	0.728
- Dietary fiber (g)	18.93 $\pm$ 3.35	21.18 $\pm$ 4.03	0.817
- Fat (g)	30.55 $\pm$ 4.46	68.08 $\pm$ 12.33	<b>0.005</b>
-- Saturated fat (g)	7.55 $\pm$ 1.17	22.94 $\pm$ 3.84	<b>0.001</b>
-- Monosaturated fat (g)	7.37 $\pm$ 1.29	19.80 $\pm$ 3.81	<b>0.003</b>
-- Polysaturated fat (g)	7.18 $\pm$ 1.03	9.85 $\pm$ 1.81	0.417
-- Omega 3 (g)	0.28 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.49	0.817
- Cholesterol (mg)	52.81 $\pm$ 16.62	230.35 $\pm$ 28.43	<b>0.001</b>
- Sucrose (g)	6.22 $\pm$ 2.74	4.54 $\pm$ 4.03	0.643

Table 2. Comparison of daily intake between classical homocystinuria and control groups			
Nutrient	HCY (n=8)	Control (n=7)	<i>p</i> -value
Vitamins			
- Vitamin A (mg)	467.24 ± 204.10	362.99 ± 116.61	0.643
- Vitamin B <sub>6</sub> (mg)	1.30 ± 0.26	1.25 ± 0.32	1.000
- Total folate (mcg)	230.23 ± 39.34	298.52 ± 29.93	0.132
- Vitamin B <sub>12</sub>	2.41 ± 0.79	4.49 ± 1.45	0.247
- Choline (mg)	124.67 ± 30.64	254.30 ± 82.89	0.164
- Vitamin C (mg)	117.68 ± 28.68	86.55 ± 18.92	0.562
- Vitamin D (IU)	11.93 ± 3.58	118.59 ± 35.31	<b>0.001</b>
- Vitamin E (IU)	3.15 ± 0.67	5.62 ± 1.71	0.164
- Vitamin K <sub>1</sub> (mcg)	59.03 ± 22.94	53.63 ± 16.61	0.907
Minerals			
- Calcium (mg)	885.23 ± 352.58	708.46 ± 117.77	0.247
- Magnesium (mg)	203.50 ± 57.00	211.88 ± 24.78	0.297
- Phosphorus (mg)	737.85 ± 188.41	1132.98 ± 245.75	0.105
- Potassium (mg)	1670.54 ± 345.51	2251.29 ± 341.39	0.132
- Iron (mg)	16.53 ± 5.49	14.34 ± 2.75	0.562
- Zinc (mg)	9.55 ± 3.16	10.98 ± 2.31	0.247
- Selenium (mcg)	45.97 ± 8.74	105.51 ± 26.88	<b>0.027</b>
<p>HCY, classical homocystinuria            Numerical variables were summarized as means ± SEM and compares using Mann-Whitney <i>U</i> test.            Significant <i>p</i>-values (&lt;0.05) highlighted in bold.</p>			

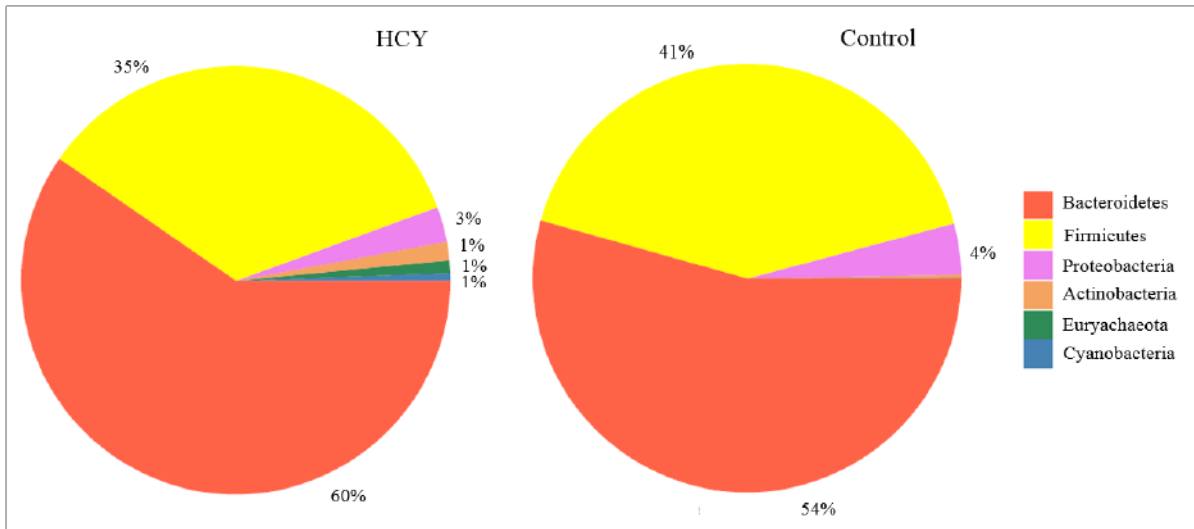


Figure 1. Frequencies of most abundant phyla in HCY and Control groups.

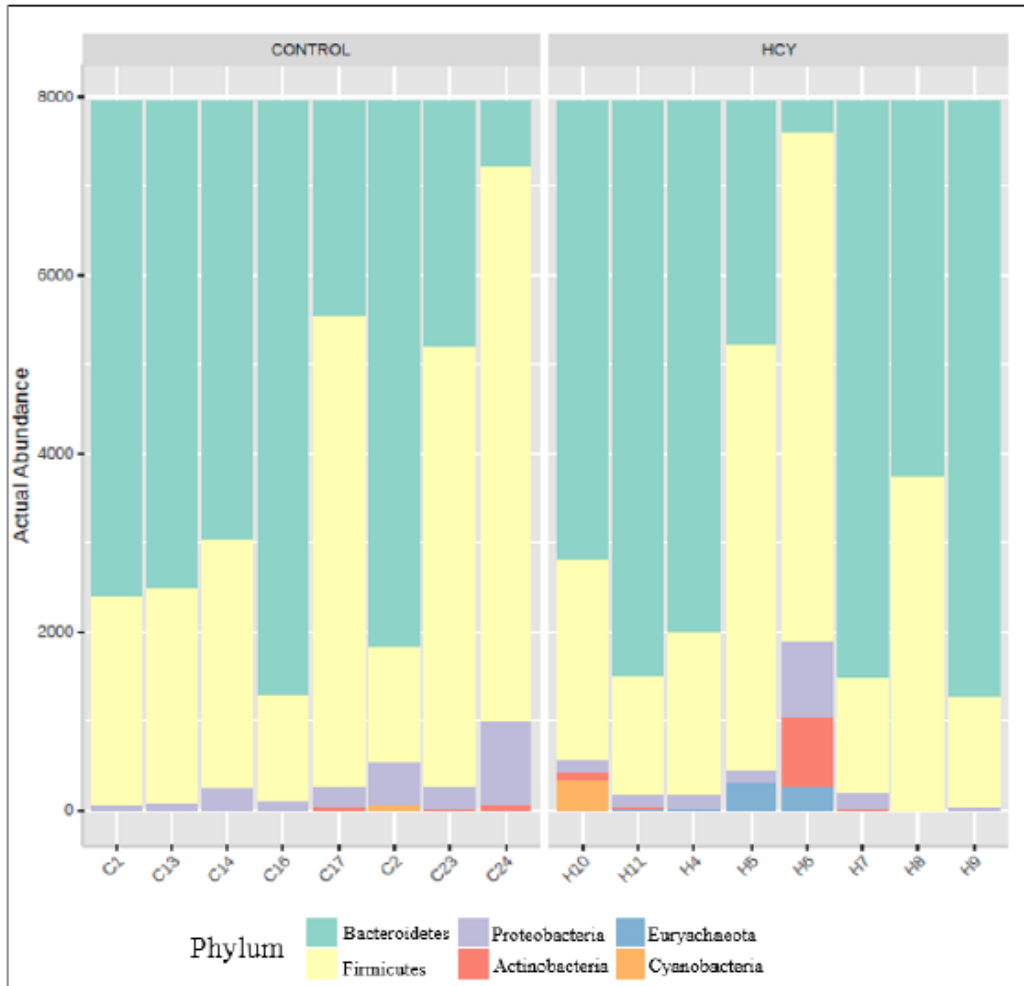
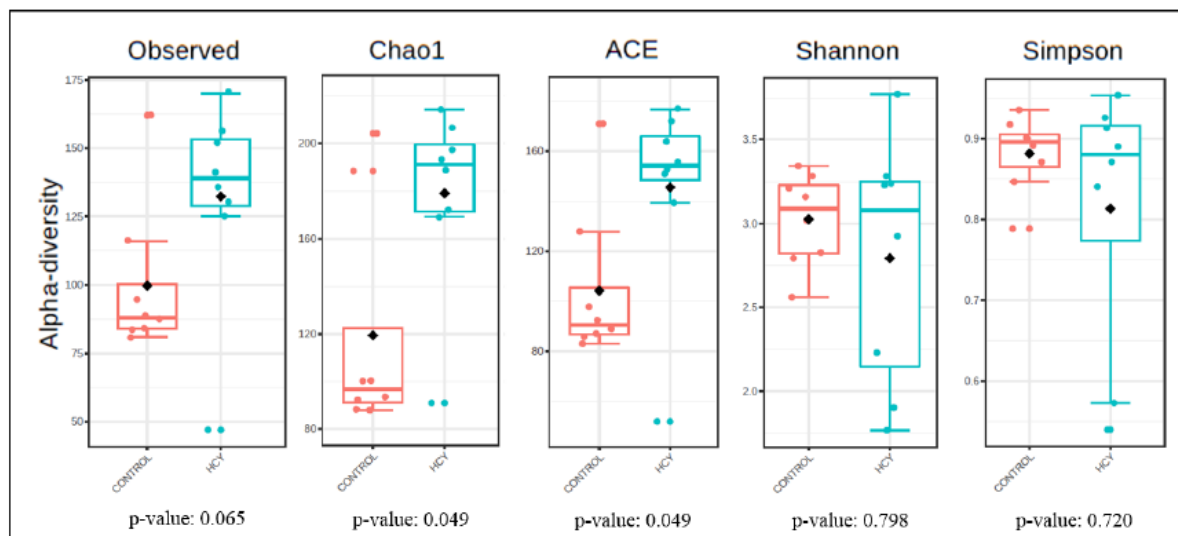
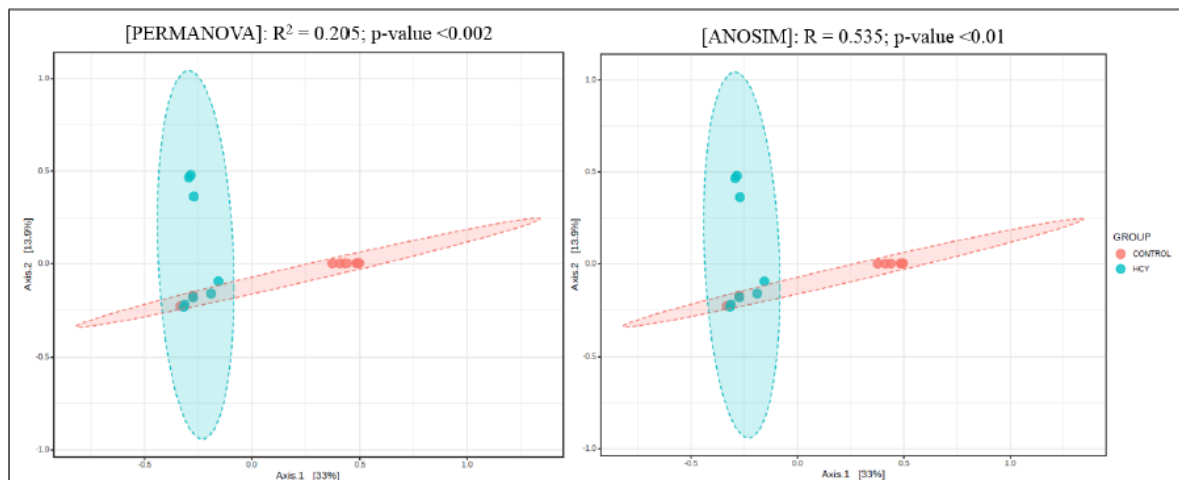


Figure 2. Frequencies of most abundant phyla per sample.



**Figure 3. Alpha-diversity measurements of microbial communities in HCY and Control groups.** Each panel represent one alpha-diversity measure as follow: Observed (total number of OTUs observed); Chao1 and ACE (richness); Shannon and Simpson (richness and evenness)



**Figure 4. Beta-diversity.** Overall comparison of microbial communities based on principal coordinates (PCoA).

Name	p-values	FDR	CONTROL	HCY	LDAscore
<i>Odoribacter</i>	0.0032531	0.061599	88.875	12.875	-1.59
<i>Parabacteroides</i>	0.0038499	0.061599	248.625	87	-1.91
<i>Collinsella</i>	0.010656	0.11367	0	3.375	0.429
<i>Eubacterium</i>	0.027279	0.17458	0	7.5	0.677
<i>Lachnobacterium</i>	0.027279	0.17458	16.625	0	-0.969
<i>Prevotella</i>	0.03725	0.19293	72.75	1655.125	2.9
<i>Methanobrevibacter</i>	0.046461	0.19293	1.375	76.375	1.59
<i>Alistipes</i>	0.064078	0.19293	0	2.375	0.34
<i>Bilophila</i>	0.072927	0.19293	35.875	19	-0.975
<i>Dorea</i>	0.073991	0.19293	56.375	20.875	-1.27
<i>Not_Assigned</i>	0.074203	0.19293	3434.125	2309	-2.75
<i>Oscillospira</i>	0.082896	0.19293	139.625	97.875	-1.34
<i>Blautia</i>	0.082896	0.19293	80.125	36	-1.36
<i>Dehalobacterium</i>	0.084407	0.19293	0.125	1.875	0.273
<i>Anaerostipes</i>	0.11008	0.23037	0.375	4.875	0.512

Table 3. Bacterial phylotypes presentes in HCY and Control groups					
Name	p-values	FDR	CONTROL	HCY	LDAscore
<i>Faecalibacterium</i>	0.11518	0.23037	655.125	226.375	-2.33
<i>Desulfovibrio</i>	0.16015	0.30146	5.125	24.75	1.03
<i>Paraprevotella</i>	0.20164	0.35848	9.125	8.875	-0.0512
<i>Catenibacterium</i>	0.2409	0.39063	3.5	21.875	1.01
<i>Sutterella</i>	0.24414	0.39063	161.875	41	-1.79
<i>Phascolarctobacterium</i>	0.26196	0.39917	83.125	100.625	0.989
<i>Streptococcus</i>	0.29148	0.42367	16.5	11.375	-0.552
<i>Veillonella</i>	0.30451	0.42367	10.25	2.375	-0.694
<i>Anaerotruncus</i>	0.44112	0.58817	0.125	2.75	0.364
<i>Clostridium</i>	0.48745	0.60864	0.25	1.125	0.158
<i>Roseburia</i>	0.49452	0.60864	229	202.5	-1.15
<i>Butyricimonas</i>	0.5274	0.62506	58.625	53	-0.581
<i>Ruminococcus</i>	0.59951	0.68515	160.125	395.75	2.07
<i>Coprococcus</i>	0.71279	0.78652	30.125	28.375	-0.273
<i>Lachnospira</i>	0.79275	0.8456	19.375	28	0.725
<i>Bacteroides</i>	0.83363	0.86053	2319	2361.375	1.35
<i>Bifidobacterium</i>	0.9127	0.9127	15.875	107.75	1.67











## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas de caracterização do microbioma intestinal ainda são um tema muito novo e ainda há muitas limitações quanto a técnica. Este foi um estudo inovador, sendo o primeiro estudo a caracterizar a microbiota intestinal de pacientes com homocistinúria clássica. Os erros inatos do metabolismo com tratamento dietético permitem uma maior inferência sobre a composição da microbiota intestinal e a sua relação com dietas e tratamentos. Infelizmente essa mesma vantagem traz algumas desvantagens, principalmente quando a dieta dos pacientes é muito restrita como no caso da homocistinúria e não é possível comparar com um controle que tenha uma alimentação semelhante.

Embora o estudo não tenha demonstrado uma relação entre algum gênero bacteriano com a variação no perfil do microbioma, foi possível verificar que os pacientes, que na maioria têm baixa aderência ao tratamento, têm um perfil microbiano muito parecido ao grupo controle.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados deste estudo planejamos desenvolver novos trabalhos para dar continuidade aos achados junto ao grupo de pesquisa:

- a) Estudo longitudinal para avaliar a variação do microbioma, principalmente quanto aos diferentes tratamentos e diferentes fases dos tratamentos.
- b) Uma análise do metaboloma e do transcriptoma para verificar metabólitos e transcritos bacterianos.
- c) Comparar o perfil microbiano da homocistinúria clássica com outros erros inatos do metabolismo a fim de analisar diferenças e semelhanças entre os perfis microbianos.