

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS SUBMETIDOS A
TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IURI VICENTE CAMARGO MORKIS

Porto Alegre, Brasil, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS SUBMETIDOS A
TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS**

IURI VICENTE CAMARGO MORKIS

Orientadora: LIANE ESTEVES DAUDT

A apresentação dessa dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil, 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Morkis, Iuri Vicente Camargo

Avaliação da microbiota intestinal em pacientes pediátricos submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas / Iuri Vicente Camargo Morkis. -- 2019.

62 f.

Orientadora: Liane Esteves Daudt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Microbiota intestinal. 2. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. 3. DECH. 4. Diversidade bacteriana. I. Daudt, Liane Esteves, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO

ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

27 / 02 / 2019

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Departamento de Hematologia Clínica/HCPA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Mariana Bohns Michalowski

Departamento de Pediatria/HCPA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra Ursula da Silveira Matte

Departamento de Pesquisa Experimental/ HCPA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em memória de Roberto Morkis

AGRADECIMENTOS

À professora Liane, pelos excelentes ensinamentos, tranquilidade e confiança em todos os momentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFRGS;

Aos pacientes e familiares, que realizaram a parte crucial deste trabalho da forma mais altruísta e generosa possível;

Aos profissionais da Unidade de Análise Molecular de Proteínas, pelo suporte nas diferentes etapas desta pesquisa;

À colega Mariela, enfermeira Priscila e graduandas do curso de Medicina Muriel e Bruna;

Aos colegas da Unidade de Bioquímica Clínica;

Aos profissionais da Unidade de Ambiente Protegido;

Aos profissionais do Setor de Limpeza e Esterilização do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do HCPA;

Ao FIPE, pela ajuda financeira para esta pesquisa;

Aos meus amigos, pelo companheirismo;

Às pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe Ivone, meu irmão Roberto e minha companheira e amor Fernanda; agradeço pelo apoio incondicional e amor;

Ao meu pai, Roberto Morkis, que mesmo não estando aqui, tenho a certeza de que me apoiou como sempre, e a quem dedico este trabalho.

RESUMO

Introdução: A microbiota intestinal exerce papel importante na regulação do sistema imune e metabolismo do TGI. No TCTH, é um dos sistemas mais afetados, visto que condicionamento, uso de antibióticos, DECH e tipo de nutrição exercem impacto no TGI. O estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota intestinal em pacientes pediátricos submetidos a TCTH. **Metodologia:** Pacientes entre 4 a 17 anos submetidos ao TCTH foram incluídos na pesquisa; aqueles sem coleta adequada de fezes pré-transplante foram excluídos. Duas amostras fecais foram coletadas; uma antes do TCTH, assim que o paciente internou, a outra no D28 pós transplante. As amostras foram congeladas a -80°C , para posterior extração de DNA bacteriano. Após extração de DNA, a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada. Os produtos de PCR foram sequenciados no equipamento Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados de sequenciamento foram processados utilizando o software QIIME, de acordo com as recomendações do *Brazilian Microbiome Project* (BMP). A determinação taxonômica das OTUs foi realizada com o classificador RDP, com índice de confiança de 0,8. **Resultados:** Treze pacientes foram avaliados. Os filos predominantes foram Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. Houve dominação intestinal por Enterobacteriaceae em dois pacientes (que foram a óbito) e Lactobacillales em um paciente (DECHa de TGI). O índice de alfa diversidade foi mais baixo nos pacientes com pior desfecho clínico, com exceção do paciente com predomínio de *Bifidobacterium*. **Discussão:** A dominação intestinal por bactérias de Enterobacteriaceae e Lactobacillales antes do TCTH foi observada nos pacientes com piores desfechos (DECHa e óbito), bem como depleção de filos protetores como

Firmicutes e Bacteroidetes. Estudos posteriores que definam a relação causal entre disbiose e desfecho clínico no TCTH são necessários para adoção de intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: microbiota intestinal, transplante de células tronco hematopoiéticas, diversidade bacteriana, DECH.

ABSTRACT

Introduction: The gut microbiota plays an important role in the regulation of the immune system and the metabolism of gastrointestinal tract. In HSCT, GIT is one of the most affected organs, since conditioning, antibiotics, GVHD and type of nutrition have major impact. The objective of this study was to characterize the intestinal microbiota in pediatric patients undergoing HSCT. Methodology: Patients aged 4 to 17 years submitted to HSCT were included in the study; those without adequate collection of pre-transplant stools were excluded. Two samples were collected; one prior to HSCT as soon as the patient was hospitalized; and other around D28 after transplantation. The samples were frozen at -80°C for further extraction of bacterial DNA. After DNA extraction, the V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified. PCR products were sequenced on the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequencing data were processed using the QIIME software, according to the recommendations of the Brazilian Microbiome Project (BMP). The taxonomic determination of OTUs was performed with the RDP classifier, with a confidence index of 0.8. Results: Thirteen patients were evaluated. The predominant phyla were Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria. There was intestinal dominance by Enterobacteriaceae in two patients (who died) and Lactobacillales in one patient (aGVHD). The alpha diversity index was lower in the patients with worse clinical outcome, except for the one patient with predominance of Bifidobacterium. Discussion: Intestinal dominance by Enterobacteriaceae and Lactobacillales bacteria before HSCT was observed in patients with worse endpoints (GVHD and death), as well as depletion of protective bacteria belonging to Firmicutes. Further studies that define the causal

relationship between dysbiosis and clinical outcome in HSCT are necessary for the adoption of therapeutic interventions.

Keywords: gut microbiota, hematopoietic stem cell transplantation, bacterial diversity, GVHD

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Abundância relativa das bactérias por paciente – Página 52

Figura 2 – Análise de coordenada principal da diversidade beta – Página 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes	página 48
Tabela 2 – Abundância relativa (%) dos filos	página 49
Tabela 3 – Ocorrências clínicas pós TCTH	página 51
Tabela 4 – Diversidade beta e filo predominante pré e pós TCTH	página 53

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGH – Aplicativos de gestão hospitalar
- BMP – *Brazilian Microbiome Project*
- DECH – Doença do enxerto contra hospedeiro
- FMT – *Fecal microbiota transplantation*
- IEC – Células epiteliais intestinais
- IL - Interleucinas
- LPS – Lipopolissacarídeo
- NGS – Sequenciamento de nova geração
- NOD-like – *Nucleotide-binding oligomerazation domain-like*
- OTU – Unidade taxonômica operacional (tb coloca em inglês)
- PAMP – Padrão molecular associado à patógenos
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- RDP – *Ribosomal database project*
- SCFA – *short chain fatty acid*
- TCTH – Transplante de células tronco hematopoiéticas
- TGI – Trato gastrointestinal
- TREGS – T Regulatórias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 CONCEITO DE MICROBIOTA.....	16
2.2 FUNÇÕES DAS BACTÉRIAS NO ORGANISMO.....	17
2.3 MICROBIOTA E SISTEMA IMUNE.....	19
2.4 MICROBIOTA NO BRASIL.....	20
2.5 MICROBIOTA E TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.....	22
2.6 ANTIBIÓTICOS, MICROBIOTA E TRANSPLANTE.....	24
2.7 MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NO TCTH.....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 OBJETIVO GERAL.....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5 METODOLOGIA.....	30
5.1 TIPO DE ESTUDO.....	30
5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	30
5.3 COLETA DE DADOS.....	30
5.4 ANÁLISE METAGENÔMICA.....	30
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	32
6. REFERÊNCIAS.....	34
7. ARTIGO.....	39
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) objetiva reestabelecer a hematopoese após regimes de quimioterapia e imunossupressão. A ablação promovida pela quimioterapia do condicionamento é seguida do repovoamento da medula óssea pelas células progenitoras infundidas (COPELAN, 2006). As indicações para o TCTH são primariamente para o tratamento das neoplasias onco-hematológicas, doenças hematológicas benignas e alguns tumores sólidos, entre outras situações clínicas (COPELAN, 2006).

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda é uma importante complicação do período pós transplante (LEE *et al.*, 2013). Ocorre quando as células do sistema imune provenientes do doador combatem as células do hospedeiro (MACKALL *et al.*, 2009). O trato gastrointestinal (TGI) é especialmente afetado por essa condição.

O TGI é um dos principais sítios de colonização de bactérias; mais de 15.000 espécies já foram identificadas em diferentes amostras humanas (DOCAMPO *et al.*, 2015). Em situação saudável, as bactérias comensais vivem em simbiose com o organismo humano. A microbiota intestinal, juntamente com as células epiteliais intestinais, possui reconhecida função na regulação do sistema imune no TGI (MAYNARD *et al.*, 2012), na inibição de potenciais patógenos e no metabolismo de alguns nutrientes (BUFFIE e PAMER, 2013).

A interação de microorganismos presentes no intestino e seus metabólitos promovem diferentes respostas do sistema imunológico. Ácidos graxos de cadeia curta (*short fatty chain acid* - SFCA) como butirato e propionato, produzidos por bactérias comensais, induzem a expansão de linfócitos T regulatórios (ARPAIA *et al.*, 2013). Por outro lado, bactérias filamentosas segmentadas podem induzir a diferenciação de

linfócitos Th17, contribuindo para a defesa antibacteriana (KHO e LAL, 2018). Além disso, diversas condições clínicas têm sido relacionadas com mudanças e desequilíbrio no microbioma, tais como artrite reumatoide (SCHER *et al.*, 2013), diabetes melitus tipo 2 e no metabolismo de fármacos (HAISER *et al.*, 2013).

No contexto do TCTH, o condicionamento é um fator de desequilíbrio da microbiota, devido aos danos causados à mucosa intestinal (DOCAMPO *et al.*, 2015). Da mesma forma, a doença do enxerto contra o hospedeiro pode amplificar esse desequilíbrio, na medida em que as células do doador reagem com as células do epitélio intestinal (SHONO *et al.*, 2015). O uso de antibióticos de amplo espectro pode alterar o microbioma, privilegiando o crescimento de algumas espécies (TAUR *et al.*, 2012). A nutrição dos pacientes também interfere na simbiose intestinal, pois é mais restritiva no cuidado e no preparo (STAFFAS *et al.*, 2017).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONCEITO DE MICROBIOTA

O termo microbiota refere-se ao conjunto de microorganismos que habitam um determinado ecossistema (LYNCH e PEDERSEN, 2016). Na espécie humana, o intestino é o principal órgão de colonização; estima-se cerca de 100 trilhões de bactérias vivendo em simbiose com um indivíduo. Mais de 15000 espécies de bactérias diferentes já foram identificadas em amostras do trato gastrointestinal humano (DOCAMPO *et al.*, 2015). A disbiose é definida pelo desequilíbrio na composição e nas funções metabólicas da microbiota de um determinado ecossistema (LYNCH e PEDERSEN, 2016).

Com relação a microbiota intestinal, os filos Firmicutes e Bacteroidetes são os prevalentes em indivíduos saudáveis; outros filos como Proteobacteria, Fusobacteria e Actinobacteria também estão presentes em menor proporção (STAFFAS *et al.*, 2017). Deve-se ressaltar que o ambiente intestinal não é homogêneo, visto que possui diferenças no pH, velocidade de fluxo e concentração de bile, fatores que podem modificar a composição bacteriana das diferentes regiões. A principal fonte de estudo de microbiota são amostras fecais que refletem a composição da parte distal do intestino grosso. Portanto, o conhecimento sobre microbiota intestinal humana refere-se, em grande parte, à microbiota do intestino grosso (FLINT *et al.*, 2012).

A composição bacteriana intestinal sofre drásticas transformações durante o desenvolvimento do indivíduo. O tipo de parto é um fator influenciador da microbiota do recém-nascido. Recém-nascidos de parto normal tendem a apresentar microbiota intestinal semelhante a microbiota vaginal e fecal da mãe (LYNCH e PEDERSEN,

2016). Além disso, têm maior quantidade de espécies de *Bifidobacterium* do que aqueles nascidos de cesárea (FLINT *et al.*, 2012). Com a introdução de alimentos sólidos, há um aumento na diversidade da microbiota e na sua capacidade funcional. A partir de 5 a 12 anos torna-se mais estável, com a prevalência de *Bacteroidetes* e mais espécies produtoras de butirato (FLINT *et al.*, 2012).

Na adolescência, outros gêneros e classes de bactérias podem surgir, como *Anaerovorax*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* e *Lachnospiraceae*, que possuem variadas funções metabólicas como envolvimento em vias de produção de folato e vitamina B12 (LYNCH e PEDERSEN, 2016). Com a chegada da idade adulta, o intestino é dominado por *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, com menores proporções de *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. Entretanto, embora a composição dos filos seja semelhante, existe uma variabilidade na predominância das espécies, de acordo com perfil nutricional e características individuais (LYNCH e PEDERSEN, 2016).

2.2 FUNÇÕES DAS BACTÉRIAS NO ORGANISMO

O sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitou o estudo aprofundado das bactérias que habitam o sistema gastrointestinal ao detectar espécies não cultiváveis, como microorganismos anaeróbios estritos. Diversas funções da microbiota intestinal no organismo humano têm sido descritas com o uso de análise metagenômica, proteômica e metabolômica. A maturação e modulação do sistema imune (ARPAIA *et al.*, 2013), proteção contra crescimento de patógenos (BUFFIE e PAMER, 2013), influência na vascularização e proliferação celular do hospedeiro e regulação de processos metabólicos já foram relacionados como funções das bactérias comensais do intestino (LYNCH e PEDERSEN, 2016).

Os produtos metabólicos das bactérias são fundamentais nos diferentes papéis exercidos pela microbiota no organismo humano. Os ácidos graxos de cadeia curta (*short-chain fatty acid* - SCFA) são os principais metabólitos gerados, provenientes da fermentação de carboidratos não digeridos (FLINT *et al.*, 2012). Butirato, por exemplo, é uma importante fonte de energia das células epiteliais intestinais. Já foi descrita que a interação de SCFA com receptores de células epiteliais intestinais induz a liberação de peptídeos envolvidos no metabolismo da glicose e controle de ingestão de alimentos (KHO e LAL, 2018). O butirato também foi estudado como um indutor de diferentes vias metabólicas de bactérias do cólon, com o objetivo de impedir o crescimento de bactérias patogênicas (CANI, 2018).

Já foi identificado que espécies de *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium lentum*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens* e *Enterococcus faecium* produzem vitamina K2, importante para o metabolismo humano. Da mesma forma, bactérias presentes no intestino são as principais produtoras de vitaminas B5 e B12, coenzimas fundamentais em diferentes processos metabólicos (KHO e LAL, 2018). Deve-se ressaltar que os fatores que afetam a composição da microbiota, tais como o pH, fluxo do intestino, o tipo de alimento ingerido e as situações em que ocorre disbiose influenciam na produção metabólica das espécies (FLINT *et al.*, 2012).

Outra função da microbiota intestinal que vem recebendo maior atenção é a interação com o eixo cérebro-intestino. A comunicação entre o sistema nervoso central e o sistema nervoso entérico (ENS) para modulação da atividade secretora e motilidade intestinal já é bem conhecida (HUANG *et al.*, 2019). Entretanto, o ENS também sofre influência direta da microbiota intestinal, na medida em que produz neurotransmissores como serotonina (*Escherichia* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.), dopamina (*Bacillus* spp.), noradrenalina (*Escherichia* spp., *Bacillus* spp., *Saccharomyces* spp.) e

GABA (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.) (NEUMAN *et al.*, 2015). Cortisol liberado em situação de estresse promove a disbiose e ruptura da barreira intestinal. Tal desequilíbrio da microbiota leva a um estado proinflamatório no indivíduo, a partir de liberação de citocinas e ativação do eixo HPA (SKONIECZNA-ZYDECKA *et al.*, 2018).

2.3 MICROBIOTA E SISTEMA IMUNE

A mucosa intestinal possui uma estrutura que impede a invasão de microorganismos patogênicos, ao mesmo tempo que permite a simbiose com a microbiota normal, a partir das células epiteliais intestinais (IECs) e células do sistema imune do intestino. Essas células intestinais do sistema imune podem estar presentes junto com as IECs, como os linfócitos intraepiteliais, ou organizado em estruturas como folículo linfóide, linfonodos mesentéricos e placa de Peyer (WANG *et al.*, 2015). O principal mecanismo de vigilância imunológica é através da interação de receptores específicos das IECs e células do sistema imune com antígenos de bactérias do lúmen intestinal, gerando uma resposta compatível com as bactérias e antígenos apresentados (PETERSON e ARTIS, 2014).

Células do epitélio intestinal e células imune intestinais apresentam receptores do tipo Toll (TLR) e receptores NOD-like que modulam a resposta imune a partir do contato com padrões moleculares associados a patógenos (PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern*) de bactérias do lúmen intestinal (LAZAR *et al.*, 2018). Em situações normais, PAMP associados a bactérias comensais ativam tais receptores e produzem uma resposta antiinflamatória. Em outras situações, a ligação de certos PAMP promove uma reação inflamatória (LAZAR *et al.*, 2018).

A partir de estímulos específicos de bactérias comensais, IECs estimulam a produção de interleucina 10 (IL-10), macrófagos e células dentríticas com propriedades tolerogênicas, além de induzir a diferenciação de linfócitos T regulatórios (Tregs). Os SCFA butirato, propionato e acetato também se mostraram importantes como indutores de linfócitos Tregs (LAZAR *et al.*, 2018). Estudo com camundongos *germ-free* mostrou falha na resposta antiviral de células NK, pois macrófagos e células dentríticas não realizaram a ativação adequada (PETERSON *et al.*, 2015).

Por outro lado, células linfoides inatas (ILC) produzem citocinas associadas a linfócitos Th1, Th2 e Th17, como IL-13, IL-17, IL-22 e Interferon-gama, com funções de regular a resposta inflamatória e regeneração epitelial local. Tal produção também é mediada por sinais específicos das IECs (PETERSON e ARTIS, 2014).

Além da indução da resposta imune, as IECs também secretam substâncias antimicrobianas, como alfa e beta-defensinas e lectinas TipoC RegIII, que atuam diretamente nos microorganismos patogênicos do lúmen intestinal. Esta secreção pode ser dependente ou independente da interação com a flora comensal do intestino, e tem como principal objetivo a proteção contra invasores patogênicos (PETERSON e ARTIS, 2014). Por exemplo, bactérias filamentosas segmentadas podem interagir com IECs e induzir a diferenciação de linfócitos Th17, responsáveis pela defesa contra microorganismos patogênicos do TGI (NOOR *et al.*, 2018).

2.4 MICROBIOTA NO BRASIL

Estudos sobre microbiota intestinal no Brasil têm sido realizadas em diferentes áreas da saúde, com as tecnologias de sequenciamento de nova geração. A avaliação da microbiota de recém-nascidos saudáveis identificou o predomínio de gênero

Escherichia e menores taxas de colonização por *Staphylococcus*, no primeiro mês de vida (BRANDT *et al.*, 2012). Tal achado difere de trabalhos em países desenvolvidos, no qual essa relação se inverte. Da mesma forma, foi observada a predominância do gênero *Escherichia* em amostras de fezes de crianças saudáveis nos períodos de três meses, seis meses e um ano de vida. Também foi relatada microbiota mais complexa e diversa ao final de 12 meses (TADDEI *et al.*, 2014).

Na investigação da microbiota intestinal de recém-nascidos com Enterocolite necrosante identificou maior risco para esta condição na presença de espécies de *Citrobacter koseri* e *Klebsiella pneumoniae*, pertencentes a família Enterobacteriaceae, bem como menor diversidade bacteriana e menor proporção de *Lactobacillus* (DOBLER *et al.*, 2017).

Uma avaliação da microbiota intestinal de indivíduos adultos estratificados quanto aos níveis e ingestão de vitamina D, identificou abundância de *Haemophilus* e *Veillonella* em indivíduos com baixa ingestão de vitamina D, bem como um aumento na concentração sanguínea de lipopolissacarídeos. Tais achados sugerem a influência da vitamina D na microbiota e no sistema imune intestinal (LUTHOLD *et al.*, 2017).

Também foi avaliada a microbiota intestinal de indivíduos com esteato-hepatite não alcoólica (NASH), e observada uma diminuição de *Faecalibacterium* e *Ruminococcus* em indivíduos magros com NASH, enquanto que indivíduos obesos apresentavam predomínio de *Lactobacillus* (DUARTE *et al.*, 2018). Estudo que analisou a microbiota intestinal de pacientes com fenilcetonúria encontrou diminuição em bactérias da classe Clostridiales e aumento de *Prevotella*, *Akkermansia* e Peptostreptococcaceae, além de menor abundância de genes relacionados a utilização de amido e açúcares, comparados com controles (PINHEIRO DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

2.5 MICROBIOTA E TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é um tratamento curativo de doenças neoplásicas e hematológicas, que envolve o condicionamento quimioterápico para ablação da medula óssea do paciente e posterior infusão de células progenitoras de origem hematopoiética de um doador. A partir do reinício da hematopoiese do paciente e da formação de novo sistema imune no paciente, postula-se a influência da microbiota nesse novo sistema imuno-hematopoiético (COPELAN, 2006).

Estudos iniciais com camundongos *germ-free* submetidos a TCTH demonstraram menor incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e mortalidade, comparados com camundongos comuns. Isso seria um indicativo da influência das bactérias comensais na DECH. Entretanto, estudos posteriores não encontraram a mesma associação (ANDERMANN *et al.*, 2018).

As tecnologias de análise metagenômica permitiram uma avaliação mais aprofundada da microbiota intestinal. A associação entre disbiose e incidência e morbidade da DECH já foi descrita (TAUR *et al.*, 2014), bem como o maior risco de infecções em estado de desequilíbrio da flora intestinal (TAUR *et al.*, 2012). Possíveis mecanismos são as agressões ao epitélio intestinal pelo condicionamento e DECH, que permitem a passagem de microorganismos e geram a resposta imune exacerbada, por ativação de linfócitos T (SHONO e VAN DEN BRINK, 2018). Essas agressões também afetam as células de Paneth, que secretam as substâncias alfa-defensinas com propriedades antibacterianas contra microorganismos patogênicos (ERIGUCHI *et al.*, 2012). O desequilíbrio nos mecanismos regulatórios do epitélio intestinal torna a microbiota suscetível ao predomínio de uma espécie patogênica, aumentando o risco de

infecções, além de criar um feedback positivo para agravamento da DECH, a partir da ativação de células T por lipopolissacarídeos (LPS) que passam pelo epitélio intestinal (DOCAMPO *et al.*, 2015).

Com relação às bactérias associadas a desfechos clínicos, a depleção de espécies de Clostridiales, do filo Firmicutes, foi associado com maior risco de DECH (STAFFAS *et al.*, 2017). Estas espécies são importantes para a homeostase intestinal, pois produzem SCFA. O gênero *Blautia* foi associado como possível protetor, melhora da sobrevivência global e menor incidência de DECH (JENQ *et al.*, 2015). A espécie *Clostridium scindens* é considerada de efeito protetor pois impede o crescimento da espécie *Clostridium difficile*, altamente patogênica nestes pacientes (SHONO e VAN DEN BRINK, 2018).

A abundância de Enterobacteriaceae, do filo Proteobacteria, foi associada com maior risco de bacteremia por bactérias gram-negativas, complicações pulmonares e mortalidade pós TCTH (SHONO e VAN DEN BRINK, 2018). Da mesma forma, a dominação intestinal por *Enterococcus*, do filo Firmicutes, foi associada com maior risco de bacteremia (TAUR *et al.*, 2012) e incidência de DECH (HOLLER *et al.*, 2014). Este gênero é considerado proinflamatório no TGI, visto que estimula a produção de fator de necrose tumoral por macrófagos e compromete a integridade do epitélio intestinal (SHONO e VAN DEN BRINK, 2018).

O filo Bacteroidetes também é considerado de efeito protetor no TCTH. Estudo em crianças verificou que nos momentos pré e pós TCTH o aparecimento de espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides* foi associada com menor incidência de DECH (BIAGI *et al.*, 2015). Outro estudo em pacientes adultos obteve resultados semelhantes com relação ao filo Bacteroidetes (DOKI *et al.*, 2017).

A diminuição da diversidade da microbiota no momento pós TCTH já foi relacionada com mortalidade global (TAUR *et al.*, 2014), ocorrência de DECH (HOLLER *et al.*, 2014) e maior risco de infecções (SHONO e VAN DEN BRINK, 2018). Tais achados estão relacionados com os estudos que observaram a predominância por *Enterococcus* ou Enterobacteriaceae associada a piores desfechos. Ou seja, o impacto do TCTH na microbiota intestinal leva a dominação intestinal por bactérias não comensais, que exercem seus efeitos patogênicos no TGI, na DECH e na bacteremia (DOCAMPO *et al.*, 2015).

2.6 ANTIBIÓTICOS, MICROBIOTA E TRANSPLANTE

Os primeiros estudos com camundongos *germ-free* que demonstraram menor incidência de DECH nesses animais submetidos a TCTH apontavam para um possível efeito patogênico da microbiota intestinal na DECH. Os estudos seguintes não obtiveram os mesmos resultados, porém tal questão não se encerrou. Análises metagenômicas têm apontado associação entre incidência de DECH e disbiose intestinal, especialmente com relação a diminuição da diversidade microbiana.

Modelos animais demonstraram o impacto da microbiota na hematopoiese. Camundongos *germ-free* apresentaram diminuição na população de precursores de células mielóides na medula óssea, comparados com animais com depleção de espécies específicas. Tais achados sugerem um papel fundamental da microbiota na expansão e diferenciação de células progenitoras da linhagem mielóide (KHOSRAVI *et al.*, 2014). Outro estudo identificou uma diminuição no número absoluto de células-tronco hematopoiéticas e células precursoras da linhagem linfóide em camundongos *germ-free* (IWAMURA *et al.*, 2017). Da mesma forma, animais tratados com antibióticos tiveram

diminuição no compartimento mielóide da medula óssea, que voltou a normalidade após o fim da administração das substâncias (YAN *et al.*, 2018). Embora diversos fatores possam alterar a hematopoiese nesse contexto, postula-se que a interação de receptores específicos (NOD1 e TLR) de células da medula óssea com produtos metabólicos de bactérias e LPS presentes na circulação sanguínea possam induzir a liberação de citocinas sinalizadores da produção e diferenciação de células hematopoiéticas (YAN *et al.*, 2018).

O impacto do uso de antibióticos no TCTH e sua relação com a disbiose também vem recebendo maior atenção. Estudo que investigou diferentes antibióticos em camundongos no TCTH demonstrou diferença na incidência de DECH, conforme o antibiótico utilizado. Drogas de amplo-espectro, como piperacilina-tazobactam e imipenem-cilastatina, tiveram piores resultados quanto a mortalidade e incidência de DECH comparados com aztreonam (SHONO *et al.*, 2015). Além disso, animais tratados com antibióticos de amplo espectro tiveram maior infiltração de linfócitos T CD4+ no tecido intestinal sem aumento de linfócitos T CD8+, e diminuição de células B (SHONO *et al.*, 2015). Outro estudo relatou maior risco de dominação intestinal por bactérias do gênero *Enterococcus* em pacientes recebendo metronidazol; também identificou maior risco de bacteremia na situação de dominação intestinal nestes pacientes (TAUR *et al.*, 2012). Tais achados demonstram que o impacto dos antibióticos na microbiota normal pode afetar desfechos clínicos importantes do transplante.

2.7 MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NO TCTH

As possibilidades terapêuticas de intervenção na microbiota intestinal têm sido estudadas em diversas áreas. A utilização de prebióticos e probióticos em situações clínicas como doença inflamatória intestinal e diarreia (ANDERMANN *et al.*, 2016), e o transplante de microbiota fecal para tratamento de infecção por *Clostridium difficile* resistente à antibiótico são exemplos de manipulação da microbiota intestinal para obtenção de desfechos clínicos favoráveis (LYNCH e PEDERSEN, 2016).

Tendo em vista os achados recentes que associaram a diversidade microbiana de pacientes submetidos a TCTH com ocorrência de bacteremia e DECH, o foco em intervenções na microbiota intestinal tem aumentado. Um estudo realizado que investigou os efeitos de probióticos em crianças e adolescentes submetidos a TCTH verificou a segurança do suplemento (LADAS *et al.*, 2016); entretanto, ainda não foi demonstrada a eficácia dessa abordagem.

O transplante de microbiota fecal (FMT) visa corrigir a disbiose intestinal do paciente a partir da administração de conteúdo de microbiota de um doador saudável. Porém, no TCTH o risco de infecções e bacteremias é consideravelmente alto e levanta questionamentos sobre a segurança do procedimento, antes de avaliar sua eficácia. Pesquisas com pacientes submetidos ao TCTH para determinar a segurança de FMT ainda observaram casos de bacteremia após o procedimento (DEFILIPP *et al.*, 2018), embora já tenha sido relatada a melhora na diversidade da microbiota intestinal (DEFILIPP *et al.*, 2018), bem como a resolução de infecção por *Clostridium difficile* resistente à antibiótico (DE CASTRO *et al.*, 2015).

O maior entendimento sobre os perfis de microbiota intestinal de pacientes submetidos ao TCTH também pode direcionar para medicina personalizada. Aqueles

indivíduos que apresentem dominação intestinal ou predomínio de espécies patogênicas, por exemplo, estariam sujeitos a um tratamento específico para bacteremias ou DECH (NOOR *et al.*, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

A perda da diversidade da microbiota intestinal vem sendo estudada no TCTH, bem como sua relação com desfechos de sobrevida global e mortalidade relacionada ao tratamento. Algumas espécies têm sido associadas com impacto negativo no transplante (TAUR *et al.*, 2012), enquanto que outras possuem possível impacto protetor (DOCAMPO *et al.*, 2015). No Brasil, estudos recentes investigaram a microbiota intestinal sob vários aspectos, como avaliação da população normal (DE MORAES *et al.*, 2017), em pacientes com câncer colorretal (THOMAS *et al.*, 2016), em recém-nascidos (MUELLER *et al.*, 2017), recém-nascidos prematuros com risco de enterocolite necrotizante (DOBBLER *et al.*, 2017) e avaliação da microbiota normal de crianças (MELLO *et al.*, 2018). Entretanto, até o momento não foram encontradas publicações investigando a relação entre a microbiota e o TCTH no Brasil. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota intestinal de pacientes pediátricos durante o TCTH num hospital universitário do sul do Brasil.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade da microbiota intestinal em pacientes pediátricos submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a influência do TCTH alogênico nas mudanças da microbiota
- b) Relacionar aspectos da microbiota intestinal com possíveis desfechos clínicos no TCTH. (Mortalidade, DECH e infecção)

5 METODOLOGIA

5.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo de coorte, no período de março de 2017 a janeiro de 2019, na Unidade de Ambiente Protegido e Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população constituiu-se nos pacientes pediátricos internados no hospital para TCTH alogênico. A amostragem da pesquisa foi por conveniência; pacientes entre 4 a 17 anos submetidos ao procedimento no período determinado foram convidados a participar. Pacientes sem uma amostra fecal adequada pré transplante foram excluídos do estudo.

5.3 COLETA DE DADOS

A coleta de dados foi realizada através do sistema AGH (Aplicativos para Gestão Hospitalar), por busca de prontuários para obtenção de informações clínicas.

5.4 ANÁLISE METAGENÔMICA

Uma amostra fecal pré transplante e outra próxima ao D28 pós transplante – após a pega neutrofílica - foram coletadas de pacientes pediátricos internados na

instituição. Cerca de 5g de fezes foram depositadas em um frasco de coleta estéril, imediatamente refrigeradas e congeladas em até 24 horas a -80C, para posterior extração de DNA.

A extração de DNA bacteriano foi realizada a partir de 220mg de conteúdo fecal, com o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após as extrações, foi determinada a pureza do DNA pela relação $A_{260/280}$, com o equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A concentração de cada amostra foi medida no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com o kit Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O DNA extraído foi armazenado em -80°C até o sequenciamento.

Para a análise metagenômica, a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com os primers 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). Da reação de PCR, 4 µL de cada produto foram analisados por eletroforese em gel agarose (2%, wt/vol) com GelRed™ (Biotium, Fremont, CA, USA) para verificar a amplificação e ausência de contaminação. A quantificação dos produtos de PCR foi feita com o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a partir do kit Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As bibliotecas de DNA geradas do processo de purificação foram processadas em pool para formação dos *templates*. Estes foram sequenciados no equipamento Ion OneTouch2™ Instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), utilizando o kit Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e o chip Ion 316™ Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Os dados de sequenciamento foram processados utilizando o software QIIME, de acordo com as recomendações do *Brazilian Microbiome Project – BMP* (PYLRO *et al.*, 2014). A filtragem de quimeras foi realizada *de novo* e com o banco de referência RDP_GOLD. A determinação taxonômica das OTUs foi realizada com o classificador RDP, com índice de confiança de 0,8. Informações clínicas dos pacientes foram obtidos dos prontuários, em até 90 dias pós transplante.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de abundância relativa foram calculados a partir da determinação taxonômica das OTUs. A partir do software QIIME, foram calculados os índices de diversidade alfa – *Chao 1*, OTUs observadas, e *PD whole tree* - pela curva de rarefação em 20000 sequências/amostra, e índice de beta-diversidade a partir de Análise de Coordenada Principal pelo teste *Weighted UniFrac*. Este teste possui a vantagem de avaliar a diferença na composição da microbiota entre duas amostras levando em consideração informações filogenéticas. Valores mais próximos de 1 indicam maior distância.

5.6 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética da instituição com o número 16-0669. Os pesquisadores assinaram dois termos de compromisso para Utilização de Dados, onde se comprometeram a preservar a privacidade dos pacientes, bem como na utilização do material biológico destes. Os pacientes e responsáveis que concordaram

em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, que abordava todos os aspectos do estudo.

REFERÊNCIAS

ANDERMANN, T. M.; REZVANI, A.; BHATT, A. S. Microbiota Manipulation With Prebiotics and Probiotics in Patients Undergoing Stem Cell Transplantation. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 11, n. 1, p. 19-28, Feb 2016. ISSN 1558-822X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26780719> >.

ANDERMANN, T. M. *et al.* The Microbiome and Hematopoietic Cell Transplantation: Past, Present, and Future. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 24, n. 7, p. 1322-1340, Jul 2018. ISSN 1523-6536 (Electronic) 1083-8791 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29471034> >.

ARPAIA, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 451-5, Dec 19 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24226773> >.

BIAGI, E. *et al.* Gut microbiota trajectory in pediatric patients undergoing hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant**, v. 50, n. 7, p. 992-8, Jul 2015. ISSN 1476-5365. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25893458> >.

BRANDT, K. *et al.* Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 2, p. 113-23, 2012. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358235> >.

BUFFIE, C. G.; PAMER, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 11, p. 790-801, Nov 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096337> >.

CANI, P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. **Gut**, v. 67, n. 9, p. 1716-1725, Sep 2018. ISSN 1468-3288 (Electronic) 0017-5749 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29934437> >.

COPELAN, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. **N Engl J Med**, v. 354, n. 17, p. 1813-26, Apr 27 2006. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641398> >.

DE CASTRO, C. G. *et al.* Fecal microbiota transplant after hematopoietic SCT: report of a successful case. **Bone Marrow Transplant**, v. 50, n. 1, p. 145, Jan 2015. ISSN 1476-5365. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25265462> >.

DE MORAES, A. C. *et al.* Enterotype May Drive the Dietary-Associated Cardiometabolic Risk Factors. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, p. 47, 2017. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28280715> >.

DEFILIPP, Z. *et al.* Third-party fecal microbiota transplantation following allo-HCT reconstitutes microbiome diversity. **Blood Adv**, v. 2, n. 7, p. 745-753, 04 2018. ISSN 2473-9537. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29592876> >.

DOBBLER, P. T. *et al.* Low Microbial Diversity and Abnormal Microbial Succession Is Associated with Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2243, 2017. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29187842> >.

DOCAMPO, M. D.; AULETTA, J. J.; JENQ, R. R. Emerging Influence of the Intestinal Microbiota during Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Control the Gut and the Body Will Follow. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 8, p. 1360-6, Aug 2015. ISSN 1523-6536 (Electronic) 1083-8791 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25708215> >.

DOKI, N. *et al.* Clinical impact of pre-transplant gut microbial diversity on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Ann Hematol**, v. 96, n. 9, p. 1517-1523, Sep 2017. ISSN 1432-0584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28733895> >.

DUARTE, S. M. B. *et al.* Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 28, n. 4, p. 369-384, 04 2018. ISSN 1590-3729. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29482963> >.

ERIGUCHI, Y. *et al.* Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. **Blood**, v. 120, n. 1, p. 223-31, Jul 5 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535662> >.

FLINT, H. J. *et al.* The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 10, p. 577-89, Oct 2012. ISSN 1759-5053 (Electronic) 1759-5045 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22945443> >.

HAISER, H. J. *et al.* Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. **Science**, v. 341, n. 6143, p. 295-8, Jul 19 2013.

ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869020>>.

HOLLER, E. *et al.* Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 20, n. 5, p. 640-5, May 2014. ISSN 1523-6536. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24492144> >.

HUANG, T. T. *et al.* Current Understanding of Gut Microbiota in Mood Disorders: An Update of Human Studies. **Front Genet**, v. 10, p. 98, 2019. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30838027> >.

IWAMURA, C. *et al.* Sensing of the microbiota by NOD1 in mesenchymal stromal cells regulates murine hematopoiesis. **Blood**, v. 129, n. 2, p. 171-176, 01 2017. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27799160> >.

JENQ, R. R. *et al.* Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 8, p. 1373-83, Aug 2015. ISSN 1523-6536. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977230> >.

KHO, Z. Y.; LAL, S. K. The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1835, 2018. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30154767>.

KHOSRAVI, A. *et al.* Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe*, v. 15, n. 3, p. 374-81, Mar 2014. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629343> >.

LADAS, E. J. *et al.* The safety and feasibility of probiotics in children and adolescents undergoing hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 51, n. 2, p. 262-6, Feb 2016. ISSN 1476-5365. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26569091> >.

LAZAR, V. *et al.* Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. **Front Immunol**, v. 9, p. 1830, 2018. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30158926>>.

LEE, S. E. *et al.* Risk and prognostic factors for acute GVHD based on NIH consensus criteria. **Bone Marrow Transplant**, v. 48, n. 4, p. 587-92, Apr 2013. ISSN 1476-5365 (Electronic) 0268-3369 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000645> >.

LYNCH, S. V.; PEDERSEN, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. **N Engl J Med**, v. 375, n. 24, p. 2369-2379, Dec 15 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27974040> >.

LUTHOLD, R. V. *et al.* Gut microbiota interactions with the immunomodulatory role of vitamin D in normal individuals. **Metabolism**, v. 69, p. 76-86, 04 2017. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28285654> >.

MACKALL, C. *et al.* Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. **Bone Marrow Transplant**, v. 44, n. 8, p. 457-62, Oct 2009. ISSN 1476-5365 (Electronic) 0268-3369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861978> >.

MAYNARD, C. L. *et al.* Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231-41, Sep 13 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972296> >.

MELLO, C. S. *et al.* Fecal microbiota analysis of children with small intestinal bacterial overgrowth among residents of an urban slum in Brazil. **J Pediatr (Rio J)**, v. 94, n. 5, p. 483-490, 2018 Sep - Oct 2018. ISSN 1678-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29049893> >.

MUELLER, N. T. *et al.* Delivery Mode and the Transition of Pioneering Gut-Microbiota Structure, Composition and Predicted Metabolic Function. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 12, Dec 2017. ISSN 2073-4425. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29207565> >.

NEUMAN, H. *et al.* Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 4, p. 509-21, Jul 2015. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701044> >.

NOOR, F. *et al.* The Gut Microbiota and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Challenges and Potentials. **J Innate Immun**, p. 1-11, Oct 2018. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30286447> >.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 141-53, Mar 2014. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24566914> >.

PETERSON, C. T. *et al.* Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. **Clin Exp Immunol**, v. 179, n. 3, p. 363-77, Mar 2015. ISSN 1365-2249 (Electronic) 0009-9104 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25345825> >.

PINHEIRO DE OLIVEIRA, F. *et al.* Phenylketonuria and Gut Microbiota: A Controlled Study Based on Next-Generation Sequencing. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157513, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27336782> >.

SCHER, J. U. *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **Elife**, v. 2, p. e01202, Nov 5 2013. ISSN 2050-084X (Print) 2050-084X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192039>>.

SHONO, Y. *et al.* Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. **Int J Hematol**, v. 101, n. 5, p. 428-37, May 2015. ISSN 1865-3774 (Electronic)0925-5710 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25812838> >.

SHONO, Y.; VAN DEN BRINK, M. R. M. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **Nat Rev Cancer**, v. 18, n. 5, p. 283-295, May 2018. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29449660> >.

SKONIECZNA-ŻYDECKA, K. *et al.* Microbiome-The Missing Link in the Gut-Brain Axis: Focus on Its Role in Gastrointestinal and Mental Health. **J Clin Med**, v. 7, n. 12, Dec 2018. ISSN 2077-0383. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30544486>>.

STAFFAS, A.; BURGOS DA SILVA, M.; VAN DEN BRINK, M. R. The intestinal microbiota in allogeneic hematopoietic cell transplant and graft-versus-host disease. **Blood**, v. 129, n. 8, p. 927-933, Feb 23 2017. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27940475> >.

TADDEI, C. R. *et al.* High abundance of *Escherichia* during the establishment of fecal microbiota in Brazilian children. **Microb Ecol**, v. 67, n. 3, p. 624-34, Apr 2014. ISSN 1432-184X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658546> >.

TAUR, Y. *et al.* The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 124, n. 7, p. 1174-82, Aug 14 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939656> >.

TAUR, Y. *et al.* Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 7, p. 905-14, Oct 2012. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22718773> >.

THOMAS, A. M. *et al.* Tissue-Associated Bacterial Alterations in Rectal Carcinoma Patients Revealed by 16S rRNA Community Profiling. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 179, 2016a. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28018861> >.

WANG, W. *et al.* Gut microbiota and allogeneic transplantation. **J Transl Med**, v. 13, p. 275, Aug 23 2015. ISSN 1479-5876 (Electronic) 1479-5876 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26298517> >.

YAN, H.; BALDRIDGE, M. T.; KING, K. Y. Hematopoiesis and the bacterial microbiome. **Blood**, v. 132, n. 6, p. 559-564, Aug 9 2018. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29853538> >.

7 ARTIGO

Caracterização da microbiota intestinal de pacientes pediátricos submetidos ao
transplante de células-tronco hematopoiéticas

Iuri Vicente Camargo Morkis, Bruna de Mello Vicente, Muriel Habigzang, Priscila
de Oliveira da Silva, Fernanda Scherer, Alessandra Paz, Liane Esteves Daudt

Correspondência:

Iuri Vicente Camargo Morkis

Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS 90035-903

Brazil

Phone: +55 51 98108 8336

E-mail: iurimorkis2@gmail.com

Estudo realizado na Unidade de Ambiente Protegido, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

RESUMO

Introdução: A microbiota intestinal exerce papel importante na regulação do sistema imune e metabolismo do TGI. No TCTH, é um dos sistemas mais afetados, visto que condicionamento, uso de antibióticos, DECH e tipo de nutrição exercem impacto no TGI. O estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota intestinal em pacientes pediátricos submetidos a TCTH. **Metodologia:** Pacientes entre 4 a 17 anos submetidos ao TCTH foram incluídos na pesquisa; aqueles sem coleta adequada de fezes pré-transplante foram excluídos. Duas amostras fecais foram coletadas; uma antes do TCTH, assim que o paciente internou, a outra no D28 pós transplante. As amostras foram congeladas a -80°C , para posterior extração de DNA bacteriano. Após extração de DNA, a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada. Os produtos de PCR foram sequenciados no equipamento Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados de sequenciamento foram processados utilizando o software QIIME, de acordo com as recomendações do *Brazilian Microbiome Project* (BMP). A determinação taxonômica das OTUs foi realizada com o classificador RDP, com índice de confiança de 0,8. **Resultados:** Treze pacientes foram avaliados. Os filos predominantes foram Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. Houve dominação intestinal por Enterobacteriaceae em dois pacientes (que foram a óbito) e Lactobacillales em um paciente (DECHa de TGI). O índice de alfa diversidade foi mais baixo nos pacientes com pior desfecho clínico, com exceção do paciente com predomínio de *Bifidobacterium*. **Discussão:** A dominação intestinal por bactérias de Enterobacteriaceae e Lactobacillales antes do TCTH foi observada nos pacientes com piores desfechos (DECHa e óbito), bem como depleção de filos protetores como

Firmicutes e Bacteroidetes. Estudos posteriores que definam a relação causal entre disbiose e desfecho clínico no TCTH são necessários para adoção de intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: microbiota intestinal, transplante de células tronco hematopoiéticas, diversidade bacteriana, DECH.

INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) objetiva reestabelecer a hematopoese após regimes de quimioterapia e imunossupressão. A ablação promovida pela quimioterapia do condicionamento é seguida do repovoamento da medula óssea pelas células progenitoras infundidas (COPELAN, 2006). A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda é uma importante complicação do período pós transplante (LEE *et al.*, 2013); ocorre quando as células do sistema imune provenientes do doador combatem as células do hospedeiro (MACKALL *et al.*, 2009). O trato gastrointestinal (TGI) é especialmente afetado por essa condição.

O TGI é um dos principais sítios de colonização bacteriana; mais de 15.000 espécies já foram identificadas em diferentes amostras humanas (DOCAMPO *et al.*, 2015). Em situação saudável, as bactérias comensais vivem em simbiose com o organismo humano. A microbiota intestinal, juntamente com as células epiteliais intestinais, possui reconhecida função na regulação do sistema imune no TGI (MAYNARD *et al.*, 2012), na inibição de potenciais patógenos e no metabolismo de alguns nutrientes (BUFFIE e PAMER, 2013).

A interação de células hematopoiéticas com bactérias intestinais promove diferentes respostas do sistema imune. Como exemplo, algumas espécies induzem a reatividade de células Th17, contribuindo para a defesa antibacteriana e doenças inflamatórias, enquanto que outras podem gerar metabólitos (ácidos graxos de cadeia curta) importantes para a tolerância imunológica no local (ARPAIA *et al.*, 2013).

No TCTH, fatores como condicionamento, DECH, nutrição e uso de antibióticos são fatores fundamentais para o desequilíbrio da flora intestinal. Alguns trabalhos já demonstraram a influência da diversidade da microbiota no decorrer do transplante,

porém resultados conclusivos ainda não foram obtidos, visto que muitos fatores são considerados confundidores. Sendo assim, o estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota intestinal nos pacientes pediátricos no momento prévio ao TCTH alogênico em um centro brasileiro, e entender o impacto no decorrer do tratamento.

METODOLOGIA

TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional no período de abril de 2017 a novembro de 2018, na Unidade de Ambiente Protegido e Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A amostragem da pesquisa foi por conveniência; pacientes entre 4 a 17 anos submetidos ao procedimento no período determinado foram convidados a participar. Aqueles sem uma amostra fecal adequada pré transplante foram excluídos do estudo.

ANÁLISE METAGENÔMICA

Duas amostras fecais foram coletadas; uma antes do TCTH, assim que o paciente internou, a outra no D28 pós transplante. Cerca de 5g de fezes foram depositadas em um frasco de coleta estéril, imediatamente refrigeradas e congeladas em até 24 horas a -80C, para posterior extração de DNA.

A extração de DNA bacteriano foi realizada a partir de 220mg de conteúdo fecal, com o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após as extrações, foi determinada a pureza do DNA

pela relação $A_{260/280}$, com o equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A concentração de cada amostra foi medida no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com o kit Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O DNA extraído foi armazenado em -80°C até o sequenciamento.

Para a análise metagenômica, a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com os primers 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). Da reação de PCR, 4 μL de cada produto foram analisados por eletroforese em gel agarose (2%, wt/vol) com GelRed™ (Biotium, Fremont, CA, USA) para verificar a amplificação e ausência de contaminação. A quantificação dos produtos de PCR foi feita com o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a partir do kit Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As bibliotecas de DNA geradas do processo de purificação foram processadas em pool para formação dos *templates*. Estes foram sequenciados no equipamento Ion OneTouch2™ Instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), utilizando o kit Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e o chip Ion 316™ Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Os dados de sequenciamento foram processados utilizando o software QIIME, de acordo com as recomendações do *Brazilian Microbiome Project* – BMP (PYLRO *et al.*, 2014). A filtragem de quimeras foi realizada *de novo* e com o banco de referência RDP_GOLD. A determinação taxonômica das OTUs foi realizada com o classificador RDP, com índice de confiança de 0,8. Índices de diversidade alfa – *Chao 1*, OTUs observadas, e *PD whole tree* - foram calculados a partir da curva de rarefação em 20000

sequências/amostra. Informações clínicas dos pacientes foram obtidos dos prontuários, em até 90 dias pós transplante.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de abundância relativa foram calculados a partir da determinação taxonômica das OTUs. A partir do software QIIME, foram calculados os índices de diversidade alfa – *Chao 1*, OTUs observadas, e *PD whole tree* - pela curva de rarefação em 20000 sequências/amostra, e índice de beta-diversidade a partir de Análise de Coordenada Principal pelo teste *Weighted UniFrac*.

ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética da instituição com o número 16-0669. Os pesquisadores assinaram dois termos de compromisso para Utilização de Dados, onde se comprometeram a preservar a privacidade dos pacientes, bem como na utilização do material biológico destes. Os pacientes e responsáveis que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, que abordava todos os aspectos do estudo.

RESULTADOS

No período de abril de 2017 a novembro de 2018, vinte (20) pacientes preenchiavam os critérios de inclusão e aceitaram participar da pesquisa. Destes, seis (6) não conseguiram coletar a amostra fecal no período adequado e foram excluídos; um (1)

paciente não teve amplificação de DNA na amostra coletada e também não participou do estudo. A tabela 1 apresenta as informações clínicas e do TCTH dos treze (13) pacientes avaliados.

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes

Paciente	Sexo	Idade	Doença	Tipo	Condic.	Antibiótico pré TCTH
1	F	9	SMD	NAP	MA	Levo
2	M	12	LMA	Haplo	NMA	Mero / Vanco / Poli B
3	M	9	Beta Talassemia	AP	MA	Metro
4	F	17	SMD	NAP	MA	Não
5	M	7	Wiscott-Aldrich	NAP	MA	Sulfa+Trime / Cipro / Metro
6	F	5	Chediak-Higashi	Haplo	NMA	Mero / Vanco
7	M	8	AA	NAP	NMA	Sulfa+Trime / Metro
8	M	10	Imunodeficiência	Haplo	NMA	Metro
9	M	4	LLA	Haplo	NMA	Sulfa+Trime / Mero / Cefepime
10	F	11	Linfocitose hemofagocítica	NAP	MA	Cefepime
11	F	10	Beta Talassemia	AP	MA	Mero / Vanco
12	F	8	LLA	NAP	NMA	Levo
13	M	4	AA	NAP	NMA	Sulfa+Trime / Levo / Metro

AA, anemia aplásica; AP, aparentado; Condic., condicionamento; Cipro., ciprofloxacino; Haplo, haploidêntico; LLA, leucemia linfóide aguda; LMA, leucemia mielóide aguda; Levo, levofloxacino; MA, mieloablativo; Mero, meropenem; Metro, metronidazol; NAP, não aparentado; NMA, não mieloablativo; Poli B, polimixina B; SMD, síndrome mielodisplásica; Sulfa+Trime, Sulfametoxazol+Trimetoprima; Vanco, vancomicina.

Um total de 5.170.939 *reads* foram gerados da análise após correção de *beads* policlonais e leituras de baixa qualidade, tendo como média 220bp. O número total de *counts* foi de 776.904. A tabela 2 apresenta a abundância relativa dos filios de bactérias nas amostras observadas. Os filios predominantes nas amostras foram Bacteroidetes, Proteobacteria e Firmicutes; Actinobacteria foi o filo predominante de uma única amostra. Fusobacteria, Tenericutes e Verrucomicrobia foram os menos frequentes. Os pacientes 2, 6, 9, 10 e 11 apresentaram abundância maior que 90% de um único filo.

Tabela 2 – Abundância relativa (%) dos filios

Tabela 2 – Abundância relativa (%) pré TCTH									
Pacientes	Bacteria	Actinobacteria	Bacteroidetes	Firmicutes	Fusobacteria	Lentisphaerae	Proteobacteria	Tenericutes	Verrucomicrobia
1	0,1		19,6	77,6	0	0,4	1,3	0,1	0,8
2	0		97,4	0,8	0	0	1,8	0	0
3	0,2		84,4	11,5	0	0	3,9	0	0
4	0		74,6	14,1	0	0	11,3	0	0
5	0,5		65,6	9,8	0	0	24,1	0	0
6	0,05		0,15	99,8	0	0	0	0	0
7		73,7	0	26,3	0	0	0	0	0
8	0,2		35	17,8	0	0	46	0,9	0
9	0		93,1	5,7	0	0,05	0,9	0	0,25
10	0		0	0,4	0	0	99,6	0	0
11	0		0	0	0	0	100	0	0
12	0,3		33,2	63,4	2,3	0	0,7	0	0,1
13	0,5		77	21,9	0	0	0,6	0	0

Legenda: Números em amarelo representam o filo predominante de cada paciente

Indivíduos com predominância relativa de Firmicutes (1, 6, 12) tiveram diferentes composições. O paciente 1 apresentou espécies da ordem Clostridiales (família Ruminococcaceae e Lachnospiraceae), o paciente 6 apresentou Lactobacillales (gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*) e paciente 12 apresentou ambas, Clostridiales (45,04%) e Lactobacillales (9,04%).

No filo Bacteroidetes, predominantes de seis pacientes, o principal representante foi do gênero *Bacteroides*. O paciente 5 apresentou predominância de espécies de *Bacteroides* (65%), mas também composição de Enterobacteriaceae (24% do gênero *Escherichia*).

A predominância do filo Proteobacteria nos pacientes 10 e 11 foi às custas da família Enterobacteriaceae. Por outro lado, o paciente 8 tinha composição distribuída entre *Escherichia* (40,54%), *Bacteroides* (26,31%) e espécies da ordem Clostridiales (17,6%). O paciente 7 foi o único com predominância de Actinobacteria, e apresentou abundância do gênero *Bifidobacterium*.

Três pacientes desenvolveram DECH aguda, e seis pacientes foram a óbito. A tabela 3 apresenta as ocorrências clínicas nos primeiros 100 dias pós TCTH, o filo predominante e o índice de diversidade alfa PD *whole tree*. Valores mais altos deste índice indicam maior diversidade dentro da amostra estudada. Os motivos de óbito foram sepse (6, 10, 11 e 12) e SARA (2 e 5). De acordo com a tabela 3, três pacientes tiveram óbito antes do D28 (10, 11 e 12). Os pacientes 2 e 6 tiveram óbito nos D50 e D72 pós TCTH, enquanto que paciente 5 teve óbito após o D100.

Tabela 3 – Ocorrências clínicas pós TCTH

	Infecção	DECHa	Óbito	PD <i>whole tree</i>	Filo predominante
1	Não	Não	Não	19.178	Firmicutes
2	Choque séptico	Não	Sim - D50	3.177	Bacteroidetes
3	Enterococcus	Não	Não	9.303	Bacteroidetes
4	CMV / BK / Klebsiella / Enterococcus	Não	Não	9.801	Bacteroidetes
5	CMV / BK / EBV	Não	Sim - D100	7.592	Bacteroidetes
6	CMV / KPC / VRE	TGI - I	Sim - D72	6.824	Firmicutes
7	Não	Pele	Não	4.374	Actinobacteria
8	CMV	Não	Não	15.555	Proteobacteria
9	CMV	Não	Não	8.467	Bacteroidetes
10	Sepse	Não	Sim - D15	1.638	Proteobacteria
11	Sepse	Não	Sim - D16	1.843	Proteobacteria
12	Pseudomonas / Clostridium	Não	Sim - D6	9.200	Firmicutes
13	CMV	Pele - III	Não	8.606	Bacteroidetes

Os pacientes 1 e 8 apresentaram o maior índice de diversidade alfa no estudo ($Chao1 = 298,3$ e $PD\ whole\ tree = 19,2$; $Chao1 = 207,4$ e $PD\ whole\ tree = 15,5$, respectivamente), enquanto que 10 e 11 tiveram os menores valores ($Chao1 = 12,8$ e $PD\ whole\ tree = 1,6$; $Chao1 = 16,7$ e $PD\ whole\ tree = 1,8$, respectivamente). Os pacientes 2, 6 e 7 também apresentaram baixa diversidade bacteriana intestinal. Destes, apenas o paciente 7 não foi a óbito; a predominância era de espécies de *Bifidobacterium*. A figura 1 apresenta abundância relativa de espécies por amostra.

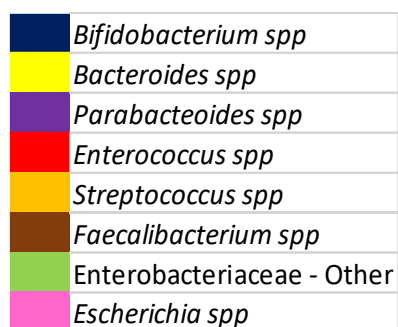
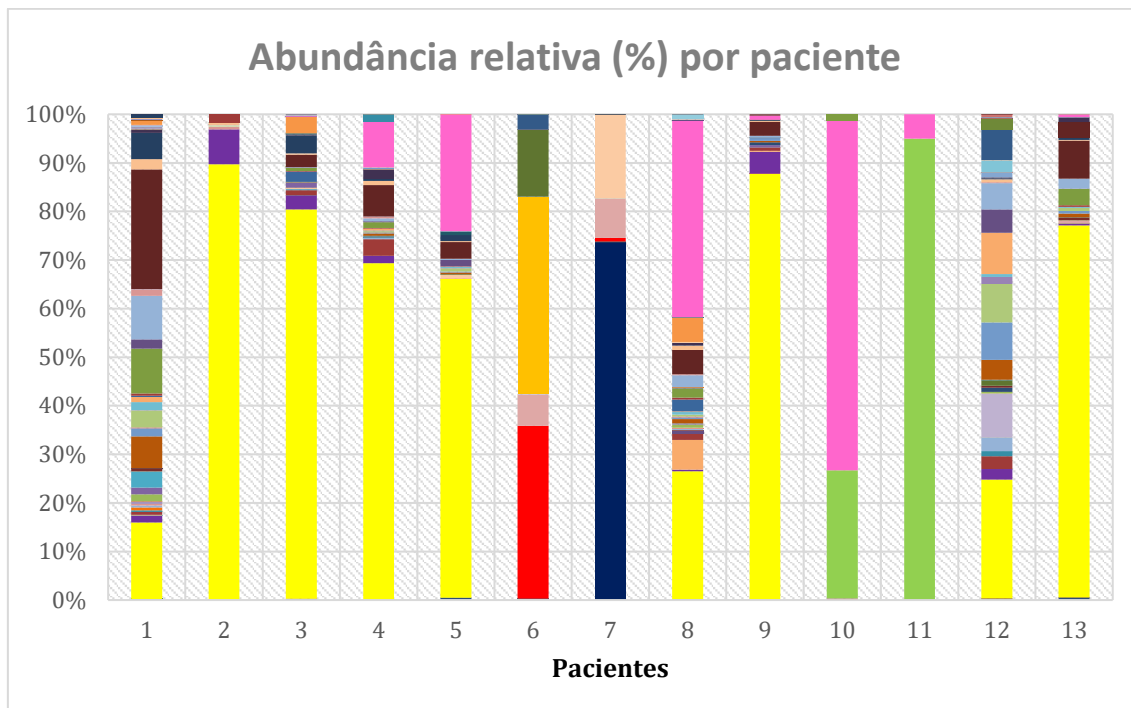


Figura 1 – Abundância relativa das bactérias por paciente.

Apenas sete pacientes coletaram a segunda amostra no D28. A diversidade beta foi avaliada a partir da comparação da microbiota antes e depois de cada indivíduo. O teste *Weighted Unifrac* indicou maiores diferença entre composição bacteriana nos pacientes 1 (*distance matrix* = 0,76), 2 (*distance matrix* = 0,70), 3 (*distance matrix* = 0,49), 4 (*distance matrix* = 0,72). A tabela 4 apresenta os índices de diversidade beta para cada paciente e os filos predominantes em ambos momentos.

Tabela 4 – Diversidade beta e filo predominante pré e pós TCTH

	<i>Distance matrix</i>	Filo Pré TCTH	Filo Pós TCTH	DECHa	Óbito
1	0,76	Firmicutes	Bacteroidetes (97%)	Não	Não
2	0,70	Bacteroidetes	Firmicutes (50%)	Não	D50
3	0,49	Bacteroidetes	Proteobacteria (57%)	Não	Não
4	0,72	Bacteroidetes	Proteobacteria (100%)	Não	Não
5	0,37	Bacteroidetes	Proteobacteria (69%)	Não	D100
6	0,47	Firmicutes	Proteobacteria (99%)	TGI - I	D72
7	0,26	Actinobacteria	Firmicutes (50%)	Pele	Não

O filo predominante no momento pós TCTH foi Proteobacteria, presente em 4 pacientes. Todos indivíduos tiveram mudança do filo predominante nos momentos pré e pós TCTH. A figura 2 apresenta o gráfico de Análise de Coordenada Principal (PCoA) para o teste *Weighted Unifrac*.

O paciente 1, que apresentava uma microbiota diversa antes do transplante, teve uma mudança considerável para Bacteroidetes (gênero *Bacteroides* 81,68%) no momento pós TCTH. O paciente 2 apresentava uma microbiota com baixa diversidade pré TCTH, e mudou para microbiota mais diversa no momento pós TCTH, com espécies de Firmicutes da ordem Clostridiales e Lactobacilales (*Streptococcus*). Este indivíduo foi a óbito no D50 pós TCTH por sepse.

O indivíduo 3 e 5 apresentaram mudança na composição bacteriana para o filo Proteobacteria (*Escherichia* 56,68% e 68,8%, respectivamente). O paciente 5 foi a óbito após o D100. Da mesma forma, o paciente 4 apresentou no momento pós TCTH

dominação intestinal por bactérias da família Enterobacteriaceae. Este teve ocorrências infecciosas, mas não foi a óbito.

O paciente 6, que apresentava uma microbiota considerada patogênica (*Streptococcus* e *Enterococcus*), teve dominação intestinal por bactérias da família Enterobacteriaceae no momento pós transplante. Este foi a óbito por sepse no D72. Apenas o indivíduo com predomínio de *Bifidobacterium* no momento pré TCTH teve menor alteração na composição bacteriana, embora também tenha mudado o filo predominante.

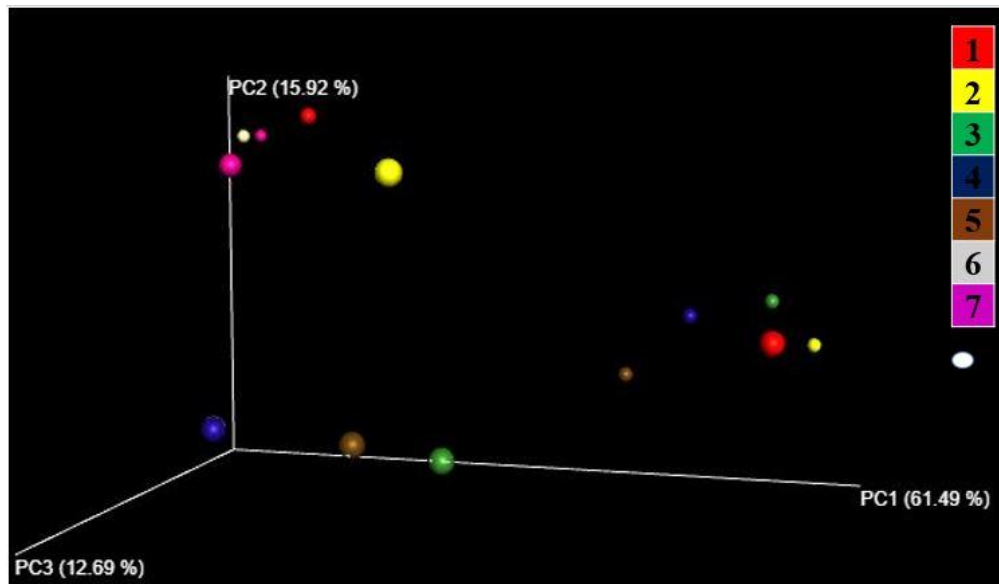


Figura 2. Análise de Coordenada Principal da diversidade beta. As cores indicam cada paciente, conforme indicado na legenda. As esferas maiores indicam a amostra pós TCTH, e as esferas menores indicam o momento pré TCTH.

DISCUSSÃO

Estudos com microbiota intestinal no TCTH têm demonstrado correlação entre disbiose e desfechos clínicos, e o papel de certas bactérias como protetoras e patogênicas. Em pacientes pediátricos, observa-se resultados semelhantes, embora menor quantidade de publicações nesse tema. O presente trabalho buscou caracterizar a microbiota pré TCTH dos pacientes pediátricos internados, e avaliar a mudança na microbiota no momento pós TCTH. Devido ao baixo número amostral e elevado número de possíveis confundidores, optou-se por não realizar testes estatísticos de correlação.

O filo Proteobacteria foi predominante em três pacientes no momento pré TCTH. Destes, dois foram a óbito por sepse. Apresentavam dominação intestinal por espécies de Enterobacteriaceae, associada com maior risco de bacteremia e diminuição da sobrevida global. O paciente que não foi a óbito apresentava menor quantidade de Proteobacteria (46%), além de outros gêneros, como *Bacteroides* (26%), *Prevotella* (6%) e *Faecalibacterium* (5%).

Com relação ao filo Firmicutes, o predomínio de bactérias do gênero *Enterococcus* foi apontada como possível associação com DECHa, sendo considerado proinflamatório no TGI (DOCAMPO *et al.*, 2015). Além disso, a dominação intestinal por este gênero esteve associada com maior risco de bacteremia. Neste trabalho, observamos a ocorrência de DECHa no trato gastrointestinal em paciente com dominação intestinal por espécies da família Lactobacillales (gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*) no momento pré TCTH. Este paciente foi a óbito por sepse.

Por outro lado, o filo Firmicutes também abrange bactérias com efeitos benéficos, devido a presença de espécies de *Clostridium* não inflamatórias - produtores de SCFA (SIMMS-WALDRIP *et al.*, 2017). Estudo com pacientes adultos que avaliou a microbiota intestinal antes do TCTH relacionou a depleção de espécies da família Ruminococceae (do filo Firmicutes) e maior risco de bacteremia (MONTASSIER *et al.*, 2016). Dos outros dois pacientes com predomínio de Firmicutes, um não desenvolveu complicações clínicas (apresentava Ruminococceae e Lachnospiraceae), enquanto que o outro foi a óbito por sepse (apresentava *Leuconostoc*, Ruminococceae e Lachnospiraceae). O gênero *Blautia*, pertencente ao filo Firmicutes, foi associado como possível protetor, melhora da sobrevida global e menor incidência de DECH (JENQ *et al.*, 2015). Este gênero foi observado em apenas um paciente e com baixa abundância (7,5%); o paciente foi a óbito por sepse.

Foi observada predominância de Bacteroidetes em seis (6) pacientes; um (1) destes desenvolveu DECHa e outros dois pacientes foram a óbito. O principal componente deste filo foi *Bacteroides*. Tal gênero foi relatado como protetor de DECHa, tanto no momento pré-transplante (DOKI *et al.*, 2017) quanto pós transplante (BIAGI *et al.*, 2015). O gênero *Bacteroides* contempla muitas espécies produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (*short chain fatty acid* – SCFA), o que explicaria sua função protetora. Entretanto, deve-se ressaltar a baixa diversidade bacteriana dos pacientes; mesmo com bactérias possivelmente protetoras, a riqueza das espécies é importante para a microbiota saudável.

Diversos estudos têm demonstrado que a disbiose intestinal no TCTH está relacionada com agravamento da DECHa, bacteremias e óbito (TAUR *et al.*, 2014). Neste estudo, observou-se maior número de óbitos nos pacientes com menor diversidade bacteriana e dominação intestinal no período pré TCTH. Apenas o paciente

com predominância de *Bifidobacterium* sobreviveu deste subgrupo. Com relação a mortalidade, três pacientes foram a óbito antes do D28. Dois destes apresentavam a menor diversidade bacteriana no momento pré TCTH, sugerindo a importância da avaliação da microbiota no momento pré transplante.

A comparação dos momentos pré e pós transplante no subgrupo de sete pacientes demonstrou acentuada alteração na composição bacteriana. Os indivíduos apresentaram um alto índice de diversidade beta e mudança do filo predominante na segunda coleta. O filo predominante no momento pós TCTH foi Proteobacteria. Deve-se ressaltar que os pacientes já apresentavam uma microbiota alterada na primeira coleta, o que reforça o impacto que o transplante causa na microbiota intestinal.

Três pacientes tiveram dominação intestinal pós TCTH; um foi a óbito (que já apresentava microbiota patogênica antes do TCTH, por Lactobacillales), outro teve complicações infecciosas e sobreviveu. Outro paciente com predomínio de *Bacteroides* pós TCTH não teve complicações infecciosas. Por outro lado, um paciente que tinha uma microbiota com baixa diversidade pré TCTH demonstrou uma microbiota mais diversa no momento pós transplante, e também foi a óbito. Tais achados podem indicar a importância da avaliação da microbiota pré transplante para o acompanhamento do tratamento.

A composição da microbiota intestinal varia consideravelmente com o passar dos anos. No período da infância inicia o predomínio dos filos Bacteroidetes e Firmicutes tal como nos adultos, porém a composição tem diferenças acentuadas no nível de espécie. Além disso, nesta fase ocorrem flutuações importantes, conforme mudam alimentação, estilo de vida e uso de antibióticos (RINGEL-KULKA *et al.*, 2013). Sendo assim, é fundamental o estudo da microbiota desta população nas situações normais e patológicas.

O estudo teve vieses que impossibilitaram a extrapolação dos resultados. O baixo número de pacientes incluídos, a dificuldade em obter a coleta de fezes dos pacientes pediátricos e os diversos fatores confundidores do TCTH impediram a associação estatística dos dados com desfechos clínicos. Entretanto, foi possível observar um índice de diversidade microbiana baixo nos pacientes, e dominação intestinal por bactérias da família Lactobacillales e Enterobacteriaceae associadas a piores desfechos.

O presente trabalho demonstrou aspectos importantes da microbiota intestinal dos pacientes pediátricos no momento anterior ao TCTH. Estudos que demonstrem a associação causal entre desfechos clínicos e microbiota são fundamentais para possíveis intervenções terapêuticas no futuro.

REFERÊNCIAS

ARPAIA, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 451-5, Dec 19 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24226773> >.

BIAGI, E. *et al.* Gut microbiota trajectory in pediatric patients undergoing hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant**, v. 50, n. 7, p. 992-8, Jul 2015. ISSN 1476-5365. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25893458> >.

BUFFIE, C. G.; PAMER, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 11, p. 790-801, Nov 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096337> >.

COPELAN, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. **N Engl J Med**, v. 354, n. 17, p. 1813-26, Apr 27 2006. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641398> >.

DOCAMPO, M. D.; AULETTA, J. J.; JENQ, R. R. Emerging Influence of the Intestinal Microbiota during Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Control the Gut and the Body Will Follow. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 8, p. 1360-6, Aug 2015. ISSN 1523-6536 (Electronic) 1083-8791 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25708215> >.

DOKI, N. *et al.* Clinical impact of pre-transplant gut microbial diversity on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Ann Hematol**, v. 96, n. 9, p. 1517-1523, Sep 2017. ISSN 1432-0584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28733895> >.

JENQ, R. R. *et al.* Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 8, p. 1373-83, Aug 2015. ISSN 1523-6536. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977230> >.

LEE, S. E. *et al.* Risk and prognostic factors for acute GVHD based on NIH consensus criteria. **Bone Marrow Transplant**, v. 48, n. 4, p. 587-92, Apr 2013. ISSN 1476-5365 (Electronic) 0268-3369 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000645> >.

MACKALL, C. *et al.* Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. **Bone Marrow Transplant**, v. 44, n. 8, p. 457-62, Oct 2009. ISSN 1476-5365 (Electronic) 0268-3369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861978> >.

MAYNARD, C. L. *et al.* Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231-41, Sep 13 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972296> >.

MONTASSIER, E. *et al.* Pretreatment gut microbiome predicts chemotherapy-related bloodstream infection. **Genome Med**, v. 8, n. 1, p. 49, 04 2016. ISSN 1756-994X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121964> >.

PYLRO, V. S. *et al.* Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **J Microbiol Methods**, v. 107, p. 30-7, Dec 2014. ISSN 1872-8359. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25193439> >.

RINGEL-KULKA, T. *et al.* Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults--a high throughput microarray analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64315, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717595> >.

SIMMS-WALDRIP, T. R. *et al.* Antibiotic-Induced Depletion of Anti-inflammatory Clostridia Is Associated with the Development of Graft-versus-Host Disease in Pediatric Stem Cell Transplantation Patients. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 23, n. 5, p. 820-829, May 2017. ISSN 1523-6536. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192251> >.

TAUR, Y. *et al.* The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 124, n. 7, p. 1174-82, Aug 14 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939656> >.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição da microbiota intestinal tem sido objeto de estudo em diversas áreas da saúde. A sua função na regulação do metabolismo, do sistema imune intestinal, na proteção contra patógenos, entre outros, justificam essa importância. Crianças estão mais propensas às flutuações na composição da microbiota, tendo em vista que ela ainda não está bem consolidada. No TCTH, essa flutuação deve ser ainda mais acentuada, visto que condicionamento, uso de antibióticos, alteração no hábito alimentar e DECH atingem o TGI e as bactérias comensais.

O presente estudo caracterizou a microbiota intestinal pré TCTH alogênico de pacientes pediátricos no nosso meio. Verificou-se uma baixa diversidade bacteriana, com acentuada dominância intestinal de bactérias de Lactobacillales e Enterobacteriaceae e maior ocorrência de óbitos nestes pacientes. Além disso, os pacientes com maior índice de diversidade alfa tiveram menos ocorrências clínicas desfavoráveis. Entretanto, tais resultados não foram extrapolados pelo baixo número de pacientes incluídos na pesquisa e grande número de variáveis associadas, mas trazem importantes questionamento para o seguimento e manejo destes pacientes

Foi possível demonstrar aspectos importantes da microbiota intestinal dos pacientes pediátricos no momento anterior ao TCTH. Estudos que demonstrem a associação causal entre desfechos clínicos e microbiota são fundamentais para possíveis intervenções terapêuticas no futuro.