

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE MODELO ANIMAL DE
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I**

Mônica Hoeveler

Dissertação submetida ao Programa de Programa
de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular como requisito para obtenção do grau
de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**

Orientadora: Profª. Dra. Ursula da Silveira Matte

Porto Alegre, Março de 2020

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no Centro de Terapia Gênica, Unidade de Experimentação Animal, Unidade de Pesquisa Laboratorial e Unidade de Patologia Experimental do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

As fontes financiadoras foram o Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq – Bolsa Mestrado).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Dra. Ursula Matte por toda compreensão e ensinamentos dispensados a mim durante esse período de orientação, e por essa oportunidade de desenvolvimento em diversos aspectos.

À Me. Gerda Cristal Villalba Silba pela colaboração, coleguismo e incentivo no projeto.

Aos Me. Esteban Alberto Gonzalez, Me. Édina Poletto e Me. Luisa Natalia Pimentel Vera pelos ensinamentos sobre como trabalhar com animais de laboratório.

Aos demais colegas do Centro de Terapia Gênica pelo apoio, ensinamentos e companheirismo.

Ao Dr. Michael Everton Andrades e Dra. Marina Siebert da Unidade de Pesquisa Laboratorial por apoio e execução de questões técnicas do projeto.

Ao Sr. Elmo Cardoso do PPGBM por seu apoio na parte burocrática e simpatia.

E por fim a minha família e meu noivo Daniel pelo apoio, carinho e compreensão.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Mucopolissacarídeos.....	11
1.2 Mucopolissacarídeo tipo I.....	12
1.2.1 Tratamentos.....	14
1.2.2 Modelo Animal.....	14
1.3 Microbioma.....	15
1.3.1 Ação do microbioma sobre o sistema nervoso central.....	16
1.3.2 Análise de Microbioma.....	17
1.4 Justificativa.....	19
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Primário.....	20
2.2 Objetivo Secundário.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Desenho do Estudo.....	21
3.2 Modelo Animal.....	21
3.3 Coleta e Armazenamento do Material Biológico.....	22
3.4 Extração e quantificação do DNA.....	22
3.5 Amplificação e Sequenciamento.....	23
3.6 Análise dos Dados.....	24
3.7 Avaliação da Ativação da Micróglia.....	24
3.8 Cálculo do Tamanho Amostral.....	25
3.9 Considerações Éticas.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Peso.....	26

4.2 Caracterização da microbiota.....	26
4.2.1 Curva de Rarefação.....	27
4.2.2 Índices de Diversidade.....	27
4.2.3 Beta Diversidade.....	28
4.2.4 Riqueza	29
4.2.5 Filo	30
4.2.6 Classe.....	33
4.1.7 Ordem	36
4.3 Marcação por Imunohistoquímica	39
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP – *Brazilian Microbiome Project*

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DBCA – Diretriz Brasileira para o Controle de Animais

EC – *Enzyme Commission Number* – Nomenclatura oficial da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) para enzimas

GAGs – Glicosaminoglicanos

GFAP – *Glial fibrillary acidic protein* – Proteína glial fibrilar ácida

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSCT – Transplante de células tronco hematopoiéticas

IDUA – α -L-iduronidase

IgA – Imunoglobulina da classe A

KO – Grupo afetado *Idua* -/-

MPS – Mucopolissacaridoses

MPS I – Mucopolissacaridose tipo I

MPS I H – Síndrome de Hurler

MPS I H/S – Síndrome de Hurler/Scheie

MPS I S – Síndrome de Scheie

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

OTU – Unidade operacional taxonômica

PCR – Reação em cadeia da DNA Polimerase

QIIME - *Quantitative Insights into Microbial Ecology*

SCFA – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

TGI – Trato Gastrointestinal

TRE – Terapia de Reposição Enzimática

WT – Grupo controle *Idua* +/-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de MPS, síndrome associada e enzimas afetadas.....	11
Tabela 2: Tempos de amostragem, tipo de extração e número amostral	23
Tabela 3: Índices de Shannon	28
Tabela 4: Índices de Simpson	28
Tabela 5: Valores de significância pelo teste estatístico para filo.....	31
Tabela 6: Valores de significância pelo teste estatístico para classe.....	34
Tabela 7: Valores de significância pelo teste estatístico para ordem.....	37
Tabela 8: Resultados da avaliação da marcação por anti-GFAP	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linha de tempo	21
Figura 2: Gráfico de variação de peso por animal.....	26
Figura 3: Curva de rarefação	27
Figura 4: Gráfico de dispersão da beta diversidade.....	29
Figura 5: Gráfico de riqueza de espécies.....	29
Figura 6: Proporção dos 5 filas mais representativos em cada grupo	30
Figura 7: Gráfico de dispersão de coordenadas principais de filo.....	31
Figura 8: Diagramas de caixa das proporções dos principais filas	32
Figura 9: Cinco classes mais representativas	33
Figura 10: Gráfico de dispersão de classe	34
Figura 11: Diagramas de caixa das proporções das primeiras 3 classes mais representativas	35
Figura 12: Cinco ordens mais representativas.....	36
Figura 13: Gráfico de dispersão de ordem.....	37
Figura 14: Diagramas de caixa das proporções de algumas ordens	38
Figura 15: Cortes histológicos de córtex e cerebelo de camundongos KO e WT corados com anti-GFAP.	39

RESUMO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência de α -L-iduronidase (IDUA), que leva ao acúmulo de dermatan e heparan sulfato. A microbiota intestinal é a comunidade de microrganismos simbióticos que habitam o trato digestivo. Em condições patológicas, a composição da microbiota pode ser perturbada, um fenômeno chamado disbiose. A disbiose é prejudicial para o hospedeiro e está relacionada à patologia cerebral. Este trabalho tem como objetivo investigar a composição da microbiota no modelo animal da MPS I. Camundongos C57BL/6 *Idua*^{-/-} (n=6) foram comparados aos seus irmãos não afetados (n=6). As amostras fecais foram coletadas aos 60 e 120 dias de vida e a região V4 do rRNA *16S* foi sequenciado por sequenciamento de nova geração. Córtex e cerebelo foram coletados aos 120 dias e corados por imunohistoquímica com anti-GFAP. As áreas coradas foram analisadas com o software *ImageJ*. Os dados de sequenciamento foram analisados no ambiente R usando um *pipeline* desenvolvido pelo nosso grupo. Os dois filos mais prevalentes foram *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Embora pareça que os camundongos MPS I tenham mais *Firmicutes* do que *Bacteroidetes*, essa diferença não foi significativa. Em nível de ordem, a única diferença ocorreu com RF-39, que compreende cerca de 11% da diversidade, sendo mais prevalente em camundongos MPS I aos 120 dias ($p = 0,04$). Não houve diferença no índice de diversidade Shannon, embora o índice de diversidade de Simpson tenha mostrado tendência à diferença entre os grupos de camundongos MPS I e controles aos 120 dias ($p = 0,07$). A coloração com anti-GFAP não mostrou diferença em nenhum momento, embora para o córtex aos 120 dias houve uma tendência a maior coloração nos animais com MPS I ($p = 0,08$). Esses resultados não corroboraram a hipótese inicial de que a MPS I teria um efeito prejudicial sobre a microbiota. Os dados obtidos neste trabalho permitem apenas sugerir que o ambiente intestinal na MPS I é diferenciado, favorecendo um equilíbrio relativo diferente entre as espécies. Entretanto, estudos com animais mais velhos, e portanto mais afetados, devem ser conduzidos para confirmar estes achados.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an inborn error of metabolism caused by the deficiency of α -L-iduronidase (IDUA), that leads to accumulation of dermatan and heparan sulfate. The intestinal microbiota is the community of symbiotic microorganisms that inhabit the digestive tract. In pathologic conditions, the composition of the microbiota may be disturbed, a phenomenon called dysbiosis. Dysbiosis is detrimental to the host and is related to brain pathology. This work aims to investigate the microbiota composition in the animal model of MPS I. C57BL/6 *Idua*^{-/-} mice (n=6) were compared to their unaffected littermates (n=6). Fecal samples were collected at 60 and 120 days of life and V4 region of 16S rRNA was sequenced by next generation sequencing. Cortex and cerebellum at 120 days were collected and stained for anti-GFAP immunohistochemistry. Stained areas were analyzed with software ImageJ. Sequencing data was analyzed in R using a pipeline developed by our group. The two most prevalent phyla were *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Although it seems that MPS I mice has more *Firmicutes* than *Bacteroidetes*, this difference was not significant. At the order level, the only difference was for RF-39, that comprises around 11% of diversity, and was more prevalent in MPS I mice at 120 days (p=0.04). There was no difference at the Shannon diversity level although the Simpson diversity index showed a tendency for difference between MPS I and controls groups at 120 days (p=0.07). Anti-GFAP staining showed no difference at any time point, although for cortex at 120 days there was a tendency for higher staining in MPS I animals (p=0.08). These results do not support our previous hypothesis that MPS I exerts a detrimental effect on the microbiota. Our data suggests that intestinal environment in MPS I is different, favoring a different relative equilibrium among species. However, studies with animal of greater age, and thus more severely affected, must be conduct in order to confirm these findings.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MUCOPOLISSACARIDOSES

Mucopolissacaridoses (MPS) são causadas pela ausência e/ou deficiência específica de enzimas lisossomais responsáveis pela degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs), antigamente denominados mucopolissacarídeos. O acúmulo de GAGs parcialmente degradados interfere no funcionamento normal das células, tecidos e órgãos (OMIM, 2002).

Existem atualmente sete tipos de MPS caracterizados pela ausência ou defeito em uma de onze enzimas lisossomais específicas descritas de MPS I até MPS IX (excluindo a V e VIII, que não são mais utilizadas). Todas são de herança autossômica recessiva, com exceção do tipo II que é de herança ligada ao X (KHAN et al, 2017).

Tabela 1: Tipos de MPS, síndrome associada e enzimas afetadas.

Tipo de MPS	Nome da Síndrome	Gene	Enzimas Afetadas
MPS I	Hurler, Scheie, Hurler-Scheie	<i>IDUA</i>	α -L-iduronidase
MPS II	Hunter	<i>I2S</i>	iduronato-2-sulfatase
MPS IIIA		<i>SGHS</i>	heparan-n-sulfatase
MPS IIIB	Sanfillipo	<i>NAGLU</i>	N-acetil-glicosaminidase
MPS IIIC		<i>HGSNAT</i>	α -glicosaminacetiltransferase
MPS IIID		<i>GNS</i>	N-acetil-glicosamina 6-sulfatase
MPS IVA	Morquio	<i>GALNS</i>	N-acetil-galactosamina-6-sulfato sulfatase
MPS IVB		<i>GLB1</i>	β -galactosidase
MPS VI	Maroteaux-Lamy	<i>ARSB</i>	N-acetilgalactosamina-4-sulfatase
MPS VII	Sly	<i>GUSB</i>	β -D-glucuronidase
MPS IX	Natowicz	<i>HYAL1</i>	Hialuronidase

Fonte: KHAN et al, 2017.

GAGs são polissacarídeos sulfatados compostos pela repetição de um dissacarídeo, sendo eles um ácido urônico (ou galactose) e uma hexosamina. As hexosaminas podem ser o heparan sulfato, o dermatan sulfato, o keratan sulfato, a condroitina sulfato, e o ácido hialurônico (KHAN et al, 2017). A prevalência de MPS é estimada em 1,04 a 4,8 por 100.000 nascimentos, variando de acordo com o tipo, país ou região e grupo étnico (KHAN et al, 2017).

1.2 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I

Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença lisossômica de depósito causada por mutações no gene *IDUA*, situado no *locus* cromossômico 4p16.3, que codifica a enzima α -L-iduronidase (EC 3.2.1.76). Esta enzima hidrolisa o resíduo terminal de ácido α -L-idurônico na degradação dos GAGs dermatan e heparan sulfato no interior dos lisossomos (OMIM, 2002). Na deficiência da enzima, ocorre o acúmulo destas moléculas causando diversas manifestações no organismo. A doença apresenta um espectro de gravidade de sintomas, com a forma grave sendo denominada síndrome de Hurler (MPS I H) e a forma atenuada como síndrome de Scheie (MPS I S). As formas intermediárias são chamadas de síndrome de Hurler-Scheie (MPS I H/S) (OMIM, 2002).

Os fenótipos clínicos não são distinguíveis pelos procedimentos diagnósticos de rotina, pois todos apresentam as características de ausência da atividade enzimática e acúmulo de GAGs. Análise das mutações permite a classificação dos pacientes, mas na maioria dos casos o subtipo de MPS I é diagnosticado de acordo com critérios clínicos incluindo a idade de início, o tipo e a velocidade de progressão de sintomas (NEUFELD; MUENZER; 2014). No Brasil, a incidência de MPS I é de 0,24 por 100.000 nascimentos (FEDERHEN et al., 2020).

A MPS I H é uma doença progressiva com o envolvimento de múltiplos órgãos e tecidos que leva à morte durante a infância. Um recém-nascido com a doença tem aparência normal mas pode ter hérnias inguinais ou umbilicais. Os sinais e sintomas característicos que levam ao diagnóstico são a face típica, deformidades esqueléticas específicas da doença (chamadas coletivamente de disostose múltipla), infecções recorrentes de ouvido e nariz, hepatoesplenomegalia e língua aumentada. Cardiopatia é uma característica da doença,

sendo causa de morte de algumas crianças de menos de 1 ano de idade, antes mesmo de serem diagnosticadas. Também são sintomas da doença a perda de audição e opacificação corneal (NEUFELD; MUENZER; 2014).

O atraso no desenvolvimento se torna aparente dos 12 aos 24 meses, com o máximo de idade funcional adquirida entre 2 e 4 anos, seguida por deterioração. O desenvolvimento de linguagem é limitado pelo atraso no desenvolvimento, perda crônica de audição e a língua aumentada (NEUFELD; MUENZER; 2014). Se não submetidos a uma forma de tratamento, a evolução da doença leva à morte antes dos 10 anos de idade por complicações cerebrais ou problemas cardiorrespiratórios (GIUGLIANI et al, 2010).

A MPS I S é caracterizada por rigidez articular, como mãos em garra, doença valvular aórtica e opacificação corneal. A face típica está presente, com inteligência e estatura normais. O início dos sintomas se dá após os 5 anos de idade, com o diagnóstico realizado entre 10 e 20 anos de idade (NEUFELD; MUENZER; 2014).

A MPS I H/S tem por característica sintomas intermediários entre as duas síndromes e pouca ou nenhuma disfunção intelectual, com o início dos sintomas observados entre os 3 e 8 anos ocorrendo sobrevivência até a idade adulta. A morte normalmente se deve a eventos cardíacos ou obstrução respiratória (NEUFELD; MUENZER; 2014). A expectativa de vida é de duas a três décadas (GIUGLIANI et al, 2010).

Suspeitas clínicas podem ser averiguadas por dosagem dos níveis de GAGs na urina, mas o diagnóstico definitivo é feito pela medida da atividade enzimática da enzima α -L-iduronidase. A ocorrência de níveis normais de GAGs não deve descartar o diagnóstico caso haja suspeita clínica. Indivíduos normais possuem uma excreção de GAGs maior ao nascer, que diminui até a idade de 21 anos, portanto deve-se usar valores de referência por idade. Em seguida, cromatografia ou eletroforese é utilizada para identificar os GAGs que se encontram com concentração elevada na urina, direcionando o teste enzimático que confirmará o diagnóstico (GIUGLIANI et al, 2010).

1.2.1 Tratamentos

Existem duas opções de tratamento para a MPS I – transplante de células tronco hematopoiéticas (HSCT) e terapia de reposição enzimática (TRE). Antes de existirem essas opções, o tratamento se baseava apenas em prevenir e tratar as complicações com o apoio de uma equipe multidisciplinar, o que ainda é de grande importância. O propósito do HSCT é corrigir a deficiência enzimática indiretamente por meio do transplante de células saudáveis que fornecerão a enzima continuamente para o organismo. É um procedimento de alto risco com taxas elevadas de morbidade/mortalidade, devendo ser realizado antes dos 2 anos de idade, indicado principalmente para a forma grave da doença. Estudos sugerem que este tratamento parece alterar favoravelmente o curso da doença, diminuindo o dano intelectual e aumentando a expectativa de vida, sem entretanto melhorar as deformidades esqueléticas (GIUGLIANI et al, 2010).

A TRE consiste na administração intravenosa periódica da Laronidase, uma proteína análoga à α -L-iduronidase, produzida por engenharia genética. Ela foi aprovada para uso no Brasil em 2005. O medicamento não atravessa a barreira hematoencefálica na dosagem utilizada, sendo indicada para tratar os aspectos não neurológicos nas formas grave e intermediária da doença (GIUGLIANI et al, 2010).

Terapia gênica viral e edição genômica para o tratamento da MPS I têm sido testadas em estudos clínicos, com resultados heterogêneos e inconclusivos na mudança de escala de animais para seres humanos (VERA, L. N. P. ; BALDO, G., 2020).

1.2.2 Modelo Animal

Existem dois modelos animais de origem natural correspondentes à MPS I H, no gato (HASKINS et al., 1979) e no cão (SPELLACY et al., 1983). Também existem 3 modelos criados geneticamente, 2 nocautes e 1 *knock-in*. O primeiro modelo criado por Clarke et al (1997) teve como objetivo interromper o gene *Idua* pela disrupção do éxon 6. Esse mesmo modelo serviu como base para a criação de um modelo imunodeficiente para pesquisas de

transplantes de células tronco e terapia gênica (GARCIA-RIVERA et al., 2007). O segundo modelo criado é o usado pelo nosso grupo e descrito no parágrafo seguinte. O terceiro modelo murino criado carrega uma mutação sem sentido análoga à *IDUA-W402X* humana, gerada por *knock-in* (WANG et al., 2010).

O modelo animal murino de MPS I utilizado pelo nosso grupo consiste no nocaute do gene codificante da enzima α -L-iduronidase (*Idua -/-*). Os animais não apresentam atividade da enzima detectável e mostram níveis elevados de GAGs na urina. Este modelo foi criado por OHMI et al (2003) por uma inserção seguida por recombinação homóloga no éxon 6, utilizando um *background* genético de camundongo C57BL/6. O fenótipo apresentado simula os achados de MPS I H, contendo, entre outros, mudanças neurológicas, alterações cardiovasculares, alterações musculoesqueléticas, morte prematura em 1 ano e metabolismo alterado (MOUSE GENOME DATABASE, 2018). Este mesmo modelo já teve seu intestino examinado histologicamente para constatar o acúmulo intracelular de GAGs (GIUGLIANI, 2013). Também há evidências morfológicas e moleculares do envolvimento da ativação e resposta inflamatória da micróglia na patologia cerebral dos modelos animais da MPS I e MPS IIIB (OHMI et al, 2003).

1.3 MICROBIOMA

Microbioma significa o conjunto de todos os genomas dos microrganismos em uma determinada localização. Engloba bactérias, fungos, archaeas e vírus. (CRYAN; DINAN, 2012). O microbioma é estabelecido no nascimento com a colonização no canal de parto, sendo também demonstradas evidências de colonização intrauterina através da análise do mecônio de recém-nascidos. O estabelecimento do microbioma é influenciado pelo tipo de alimentação e o microbioma humano começa a adquirir características de adulto ao primeiro ano de vida (WANG; KASPER, 2014). Além disso, outros fatores externos como o uso de prebióticos, probióticos, inibidores da bomba de prótons e mesmo de antibióticos podem influenciar a sua composição (MOHAJERI et al., 2018).

A maioria dos microrganismos presentes no intestino vivem em simbiose, desempenhando funções benéficas ao hospedeiro e em contrapartida são beneficiados em diversas maneiras. Quando há um desequilíbrio no balanço de microrganismos de modo a causar efeitos danosos ao hospedeiro, caracteriza-se um estado chamado de disbiose (SELBER-HNAWTIL et al., 2017). A alteração da composição da microbiota intestinal pode resultar ou ser indicativa de uma patologia (CRYAN; DINAN, 2012).

O conceito de enterótipos foi estabelecido em 2011 por Arungam et al., dividindo de forma discreta os tipos de microbioma de acordo com a prevalência relativa de grupos bacterianos, independente de outros fatores (como idade, gênero, peso corporal, etc). O enterótipo 1 é caracterizado por altos níveis de *Bacteroides*, o tipo 2 por aumento da prevalência de *Prevotellae* o 3 por altos níveis de *Ruminococcus*. No entanto, mais recentemente este conceito tem sido questionado por autores que propõem uma abordagem ecológica das comunidades bacterianas intestinais (WANG; KASPER, 2014, SELBER-HNATWI et al., 2017). De qualquer forma, há evidências de que a microbiota intestinal está envolvida com o desenvolvimento e função da imunidade inata e adaptativa, na regulação da motilidade intestinal, na manutenção da integridade da barreira intestinal e na absorção de nutrientes (BERCIK, COLLINS, & VERDU, 2012).

1.3.1 Ação do microbioma sobre o sistema nervoso central

O estudo do impacto da microbiota intestinal no cérebro e no comportamento levou à evolução do termo eixo cérebro-intestino para englobar os microrganismos. Os eixos cérebro-intestino-microbiota se comunicam através de vias neuroendócrinas, neuroimunes, do sistema nervoso autônomo e do sistema nervoso entérico. Há um entendimento crescente de que as comunicações ocorrem de forma bidirecional, com a microbiota influenciando o funcionamento do sistema nervoso central, que por sua vez modifica a composição da microbiota pelos seus efeitos no sistema gastrointestinal (CRYAN; DINAN, 2012).

Vagotomias têm demonstrado o papel do nervo vago na comunicação entre os microrganismos e o sistema nervoso central, inclusive reduzindo o risco de certas doenças

neurológicas. A microbiota regula a síntese de neurotransmissores por alteração de níveis de precursores como o triptofano, que é precursor da serotonina. Síntese e liberação dos principais neurotransmissores por bactérias intestinais já foi reportada, incluindo de ácido gama-aminobutírico, noradrenalina, dopamina e acetilcolina (DINAN; CRYAN, 2017).

Os principais produtos do metabolismo bacteriano são os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) dos quais podemos citar o acetato, o butirato e o propionato. É proposto que seus efeitos centrais ocorram através de receptores acoplados à proteína-G, sendo mais provável que levem a modificações epigenéticas através de histonas deacetilases. Além disso, os SCFA são usados como fonte energética e no metabolismo (DINAN; CRYAN, 2017).

Outros mecanismos de influência da microbiota na função e no desenvolvimento cerebral ocorrem através de receptores *toll-like* (TLR) e da modulação imune da micróglia (KELLY et al., 2017). SCFA se mostraram capazes de regular a micróglia necessária para o desenvolvimento e homeostase dos tecidos cerebrais (ERNY et al, 2015).

Diferentes evidências do envolvimento da disbiose em patologias neuropsiquiátricas têm sido relatadas, por exemplo em esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão, dentre outras (ROGERS et al, 2016). Os estudos em humanos muitas vezes apresentam dificuldades no isolamento dos fatores, pois pode haver interferência da dieta, do uso de medicamentos, etc. Em pacientes com doenças do espectro autista (ASD), foi demonstrado um aumento nos níveis de SCFA nas fezes. Ainda em ASD alguns estudos com tratamento com antibiótico ou terapia de transplante fecal já foram realizados, mostrando respectivamente, melhora da sintomatologia transitória ou após 8 semanas (KELLY et al., 2017). Em Erros Inatos do Metabolismo, foram realizados estudos sobre o envolvimento da microbiota com aminoacidopatias, acidemias orgânicas e hemocromatose (COLONETTI; ROESCH; SCHWARTZ, 2018).

1.3.2 Análise de Microbioma

Os estudos de microbiota têm sido impulsionados pelo desenvolvimento de técnicas para análise de metagenômica, na qual o conjunto dos genomas de uma comunidade microbiana é determinado. O sequenciamento de nova geração (NGS) permite determinar a

diversidade microbiana por duas abordagens: sequenciamento de *amplicon* e *shotgun*. O primeiro consiste em amplificar alvos taxonomicamente informativos como o rRNA *16S* de procariotos. O sequenciamento *shotgun* reconstrói grandes fragmentos ou até todo o genoma dos organismos, sendo mais oneroso (ESCOBAR-ZEPEDA; LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015). O sequenciamento de *amplicon* também é chamado de *metabarcoding*.

O processo de metagenômica por *shotgun* se diferencia do processo de *metabarcoding* pela construção de bibliotecas e pelo processo de montagem envolvendo genomas inteiros. Os processos de chamada de genes podem ser realizados através de *reads*, por seqüências maiores de *reads* de extremidades sobrepostas chamados *contigs*, ou ambos (KUNIN et al., 2008). Seqüências repetidas, cobertura insuficiente, erros de sequenciamento, e variação a nível de cepas no conteúdo gênico resultam em genomas fragmentados após a montagem, necessitando de mais uma etapa chamada *binning* para classificar os *contigs* em grupos a nível de espécie (ALNEBERG et al., 2014).

Já na análise de *metabarcoding*, é realizado um PCR com *primers* únicos específicos para a região V4 do gene *16S* rRNA para amplificação em bactérias e archeas. Ao produto amplificado é adicionado um *barcode* para identificação das amostras. Os produtos de PCR das amostras individuais podem então ser combinados para a reação de sequenciamento massivo paralelo (KUMAR et al., 2014).

As plataformas de NGS disponíveis são capazes de sequenciar paralelamente e com baixo custo milhões de moléculas de DNA simultaneamente, com diferentes comprimentos de seqüência e rendimentos. Alguns exemplos de plataformas são a Roche 454, Illumina, Ion Torrent/S5 e PacBio RSII. A plataforma Ion Torrent/S5 (Thermo Fisher Scientific) detecta a mudança no potencial de hidrogênio gerado após a adição de um nucleotídeo em cada um de seus micropoços. O rendimento máximo dessa plataforma é de aproximadamente 60 milhões de *reads* com a média do comprimento de até 400 pb (ESCOBAR-ZEPEDA; LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015).

A análise inicial dos dados de sequenciamento é realizada pelo *software* de cada plataforma de sequenciamento, removendo *reads* de baixa qualidade e seqüências policlonais. Posteriormente pode se optar por diversos *softwares*, como mostrado por Escobar-Zepeda, León e Sanchez-Flores (2015). O *pipeline* do *Brazilian Microbiome Project* (BMP) utiliza o QIIME, que é uma ferramenta de bioinformática de código aberto focada na

análise de microbioma (CAPORASO et al., 2010). O algoritmo do BMP começa removendo *barcodes* e após filtra por qualidade, segundo o *Q score* fornecido pelo sequenciador. Após, trunca por tamanho, remove replicações, organiza por tamanho e descarta *reads* de apenas uma ocorrência. Finalmente faz um agrupamento a partir da comparação das sequências, que passam a ser denominadas Unidades Taxonômicas Operacionais (ou *OTUs* a partir da sigla em inglês). A seguir, mapeia as *reads* de acordo com uma base de dados de *OTUs* e lhes assinala uma taxonomia de acordo com um método escolhido. Após isso faz uma tabela de *OTUs* e realiza análises de diversidade variadas na mesma (PYLRO et al, 2014). Todo esse *pipeline* é realizado em ambiente R, uma linguagem de programação gratuita (R CORE TEAM , 2017).

1.4 JUSTIFICATIVA

Há evidências morfológicas e moleculares do envolvimento da ativação e resposta inflamatória da micróglia na patologia cerebral dos modelos animais da MPS I e MPS IIIB (OHMI et al, 2003). SCFA produzidos pela microbiota saudável se mostraram capazes de regular a micróglia, necessária para o desenvolvimento e homeostase dos tecidos cerebrais (ERNY et al, 2015). Dessa forma, é possível que a disbiose possa estar envolvida na fisiopatologia da doença neurológica da MPS I.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Caracterizar a constituição da microbiota intestinal em modelo animal de MPS I em comparação com o controle não afetado.

2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

1. Comparar a constituição da microbiota intestinal do modelo animal de MPS I e controle aos 60 e 120 dias de vida por sequenciamento do DNA codificante da porção do rRNA *16S*.
2. Avaliar a ativação da micróglia aos 120 dias por imunohistoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

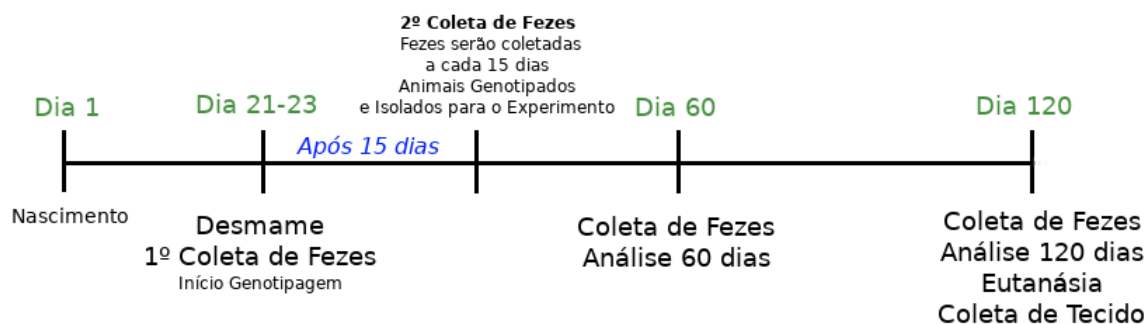


Figura 1: Linha de tempo, com MPS I.

O estudo foi desenhado de modo a ser executado em um curto espaço de tempo (1 ano) e com recursos limitados. Portanto foram determinados dois tempos de análise, com um número de animais também limitado. No entanto, foram feitas coletas em intervalos de tempo menores, para que houvesse possibilidade de analisar as outras amostras armazenadas e aumentar o número de animais a depender dos resultados encontrados.

O procedimento de genotipagem refere-se à coleta de material biológico para identificação do genótipo do animal da ninhada, para que ele seja destinado ao pesquisador, período no qual há coleta cega sem saber o genótipo do animal.

3.2 MODELO ANIMAL

Foram utilizados 6 camundongos fêmeas C57BL/6 *Idua*^{-/-} (grupo KO) e 6 de suas irmãs fêmeas normais *Idua*^{+/-} como controle (grupo WT). Estes animais são parte da colônia originada da doação realizada por Elizabeth Neufeld do modelo de MPS I desenvolvido por OHMI et al (2003).

Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal, do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas com no mínimo 1 e no máximo 3 animais/caixa, em ambiente controlado (temperatura 20-24°C, umidade relativa do ar 40-60% e sistemas de exaustão de ar) com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e alimentação comercial padrão para a espécie e água *ad libitum*. O ambiente físico interno foi designado de modo estimulatório dos comportamentos naturais da espécie como parte de enriquecimento ambiental, com materiais autoclavados e resistentes a mordidas, de modo a não introduzir microrganismos no ambiente.

3.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

A primeira coleta de fezes foi realizada no dia do desmame, data ligeiramente flexível determinada de acordo com critério veterinário – entre 21 e 23 dias. Para a coleta das fezes, os animais foram acondicionados individualmente em caixas plásticas, forradas com papel toalha estéril por 5 a 10 minutos, ou até que defecassem voluntariamente.

A coleta das fezes foi realizada em intervalos de 15 dias, sendo selecionadas para análise somente as amostras correspondentes às datas de 60 e 120 dias, por questão de custos. Os animais foram pesados quinzenalmente, à ocasião da coleta. Todas as amostras foram armazenadas à temperatura de -80°C. As amostras que iriam sofrer extração do DNA foram transferidas para freezer -20°C 24h antes por exigência da técnica.

Aos 120 dias os animais foram eutanasiados. Após a eutanásia foram coletadas amostras de córtex e cerebelo, que foram fixados em formalina tamponada para serem processados na Unidade de Patologia Experimental do HCPA.

3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O DNA genômico de todos os microrganismos presentes nas amostras avaliadas (Tabela 2) foi extraído com o *QIAamp DNA FastStool Mini Kit* (QIAGEN), específico para extração

de DNA de matéria fecal, conforme instruções do fabricante. Para alguns tempos foi necessário realizar a extração de DNA de *pool* de 2 animais em função da quantidade elevada de material requerida para cada extração do kit.

Tabela 2: Tempos de amostragem, tipo de extração e número amostral.

Grupo	Tempo	Tipo	Número de amostras	Número de indivíduos
Controle (WT 60)	60 dias	<i>Pool</i>	3	6
Controle (WT 120)	120 dias	Individual	6	6
MPS I (KO 60)	60 dias	<i>Pool</i>	3	6
MPS I (KO 120)	120 dias	Individual	6	6

3.5 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Todas as amostras foram processadas nesta etapa pela Unidade de Pesquisa Laboratorial – HCPA, conforme a metodologia a seguir. A região hipervariável V4 do gene do rRNA *16S* foi amplificada através de PCR usando DNA genômico (aproximadamente 50 ng por reação) com o par de *primers* 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Para fazer um *pool* de diferentes amostras na mesma reação foi realizada a fusão de *barcode* ao *primer forward* e cada amostra recebeu um identificador distinto em seu produto de PCR.

A amplificação foi conduzida usando *Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen). Os produtos foram verificados através de eletroforese em gel de agarose, purificados com kit de purificação *AMPure XP PCR Purification Kit (BeckmanCoulter)* e realizado uma PCR em emulsão usando *Ion Chef™ System (IonTorrent™)*. Após, ocorreu o

sequenciamento de nova geração no equipamento *Ion S5™ System (IonTorrent™)* usando *Ion 510™ Chip Kit (IonTorrent™)*.

Todos os dados brutos foram submetidos ao *pipeline* do BMP (PYLRO et al., 2014), com as seguintes modificações: filtragem de quimeras (*de novo* e utilizando o banco de referência *RDP GOLD*) após a clusterização, uso do classificador *RDP* (no lugar do *UCLUST*) e índice de confiança de 0,8 (ao invés de 0,5) na etapa de determinação taxonômica (WANG et al, 2007).

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

As análises foram realizadas através de *pipeline* desenvolvido pelo grupo de bioinformática do Centro de Terapia Gênica, disponível no *GitHub*: https://github.com/tiagofalconlopes/16SrDNA_stats. O *script* disponível online foi executado no ambiente R, juntamente com a tabela de *OTUs* gerada pelo *pipeline* do BMP e um *mapping file*. As funções de diferentes pacotes de análises de diversidade e estatística, bem como de geração de gráficos, foram executadas para gerar os diferentes gráficos usados nos resultados desta dissertação.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA MICRÓGLIA

Córtex e cerebelo de três animais de cada grupo foram coletados em formalina tamponada no momento da eutanásia aos 120 dias e submetidos à coloração por imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP. O corte inteiro foi capturado à amplificação de 200x e a intensidade de coloração foi medida com *ImageJ*. A densidade ótica foi calculada pela fórmula $\log(\text{intensidade máxima/intensidade média})$. As médias foram comparadas pelo teste t de Student.

3.8 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

Para o cálculo do tamanho de amostra foi utilizado o *software* estatístico WIN PEPI. O tamanho da amostra calculado de **12** camundongos, sendo **6** para cada grupo, teve a capacidade de detectar uma diferença de **12%** entre as porcentagens médias da abundância da filo *Bacteroidetes* como significativa, considerando o desvio padrão de **7%** comum aos grupos (dados de Sawin, 2015). Para este cálculo foi considerado poder de **80%** e nível de significância de **5%**.

3.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi submetido para avaliação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA). Os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta a utilização de animais na pesquisa científica. Os cuidados e a manipulação dos animais seguiram as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA Resolução Normativa no 30, 2016, CONCEA). Os procedimentos foram baseados na resolução 30 (2016), 33 (2016) e 39 (2018) CONCEA. A eutanásia seguiu as Diretrizes para a Prática de Eutanásia do CONCEA (RN 37 de 2018).

A eutanásia ocorreu por sobredose anestésica com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100% (fluxo de O₂ de 0,5L/min) em concentração igual ou superior a 5%, fornecido por via inalatória (câmara, cone nasal ou máscara facial). Os sinais clínicos condizentes com óbito (ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal) foram monitorados por um período adicional de 10 minutos após a parada respiratória.

4 RESULTADOS

4.1 PESO

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o peso dos animais de 60 ou 120 dias comparando o grupo WT com o grupo KO ($p = 0,92$, e $p = 0,18$ respectivamente). Os valores observados podem ser vistos na Figura 2.

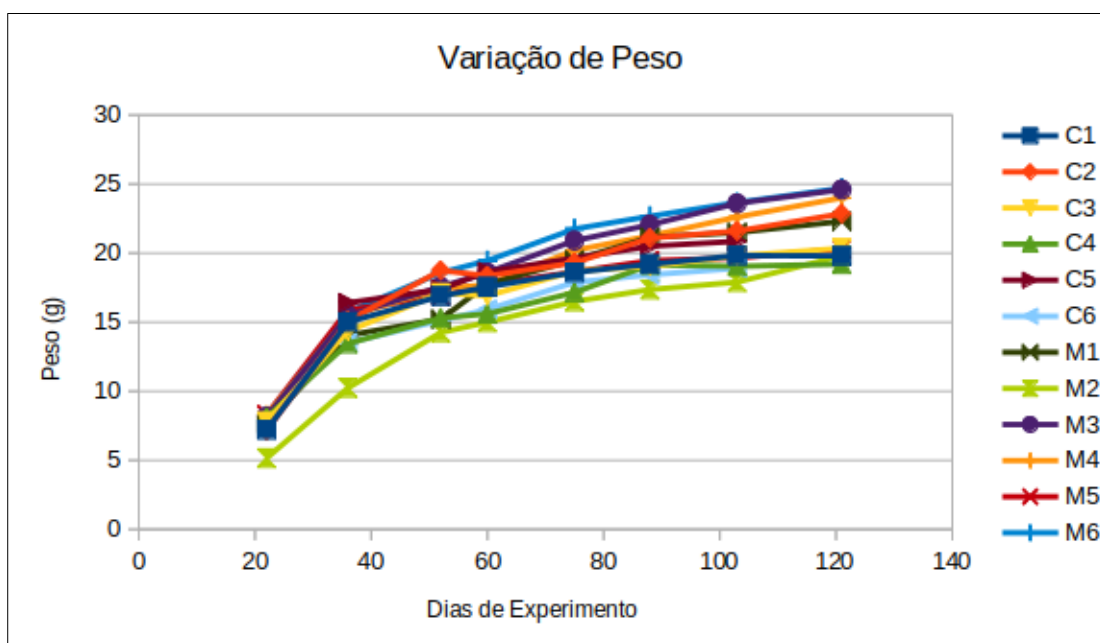


Figura 2: Gráfico de variação de peso por animal.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA

A caracterização da microbiota intestinal do modelo murino de MPS I foi realizada com base na análise de 1.515.518 *reads* sequenciados pela plataforma 5S (Thermo Fisher Scientific), com uma média de 84.200 *reads* por amostra, com um comprimento médio de 281 pares de base.

4.2.1 Curva de Rarefação

A curva de rarefação obtida (Figura 3) mostra um platô indicando que todas as amostras foram adequadamente representadas com o número de *reads* obtidos em cada uma das amostras.

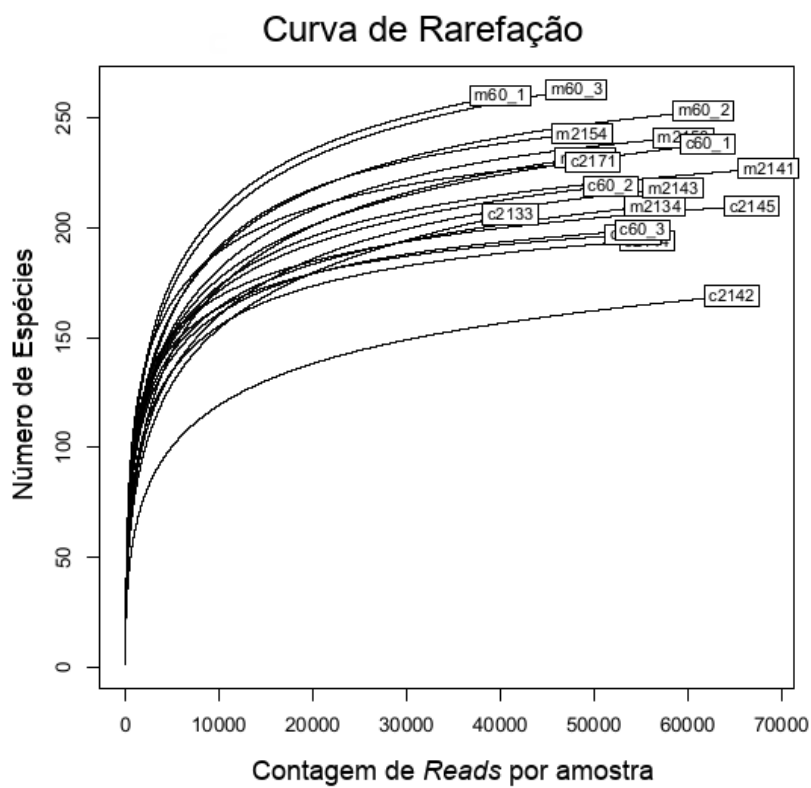


Figura 3: Curva de rarefação.

4.2.2 Índices de Diversidade

Os índices de diversidade calculados pelo Índice de Shannon e Simpson no ambiente R são mostrados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3: Índices de Shannon

Grupo	Média	DP	Teste de Tukey
WT 60	3,58	0,05	
KO 60	3,46	0,27	P> 0,999 para todas as comparações
WT 120	3,31	0,63	
KO 120	3,17	0,31	

Tabela 4: Índices de Simpson

Grupo	Média	DP	Teste de Krustal-Wallis
WT 60	0,94	0,01	
KO 60	0,91	0,025	WT 120 x KO 120: p = 0,07 WT 60 x KO 60: p = 0,59
WT 120	0,93	0,04	
KO 120	0,88	0,04	

4.2.3 Beta Diversidade

A análise dos índices de beta diversidade foi ilustrada na forma de um gráfico de dispersão por análise de coordenadas principais (Figura 4).

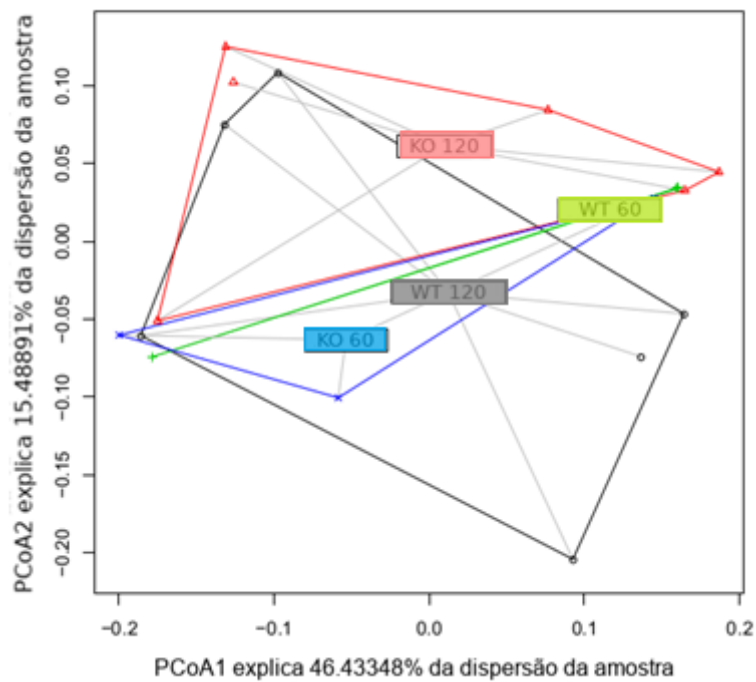


Figura 4: Gráfico de dispersão da beta diversidade

4.2.4 Riqueza

O gráfico de comparação da riqueza entre os grupos está mostrado na Figura 5. A análise estatística por teste de Tukey encontrou um valor p ajustado de 0,836 para a comparação entre WT 120 e KO 120. O valor de p ajustado encontrado para WT 60 comparado com KO 60 foi de 0,094.

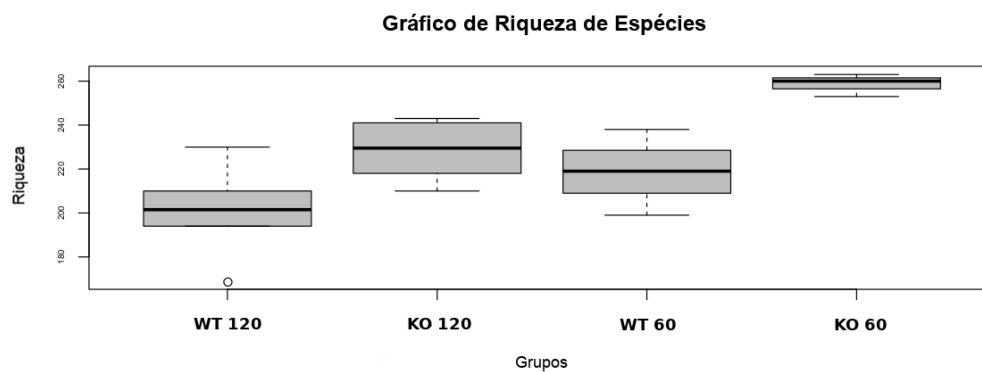


Figura 5: Gráfico de riqueza de espécies.

4.2.5 Filo

Os cinco filios principais encontrados foram *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Deferribacteria* e *Tenericutes*, estas duas últimas em menor proporção. A distribuição encontrada nos grupos está mostrada na Figura 6.

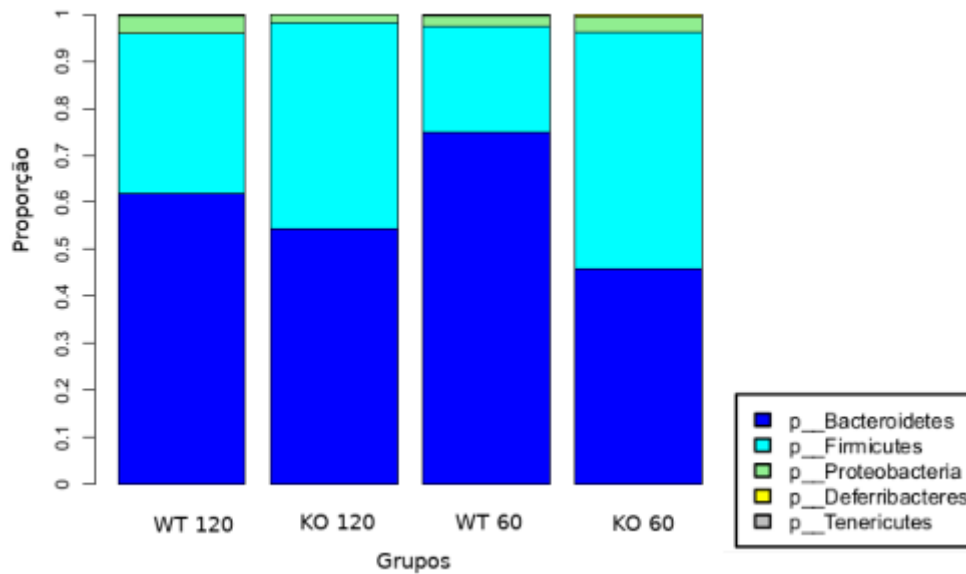


Figura 6: Proporção dos 5 filios mais representativos em cada grupo.

A Figura 7 mostra como a diversidade microbiana em nível de filo está dispersa entre os grupos. O gráfico mostra bastante sobreposição do centro dos grupos e não há diferença estatisticamente significativa na dispersão em nível de filo ($p = 0,206$).

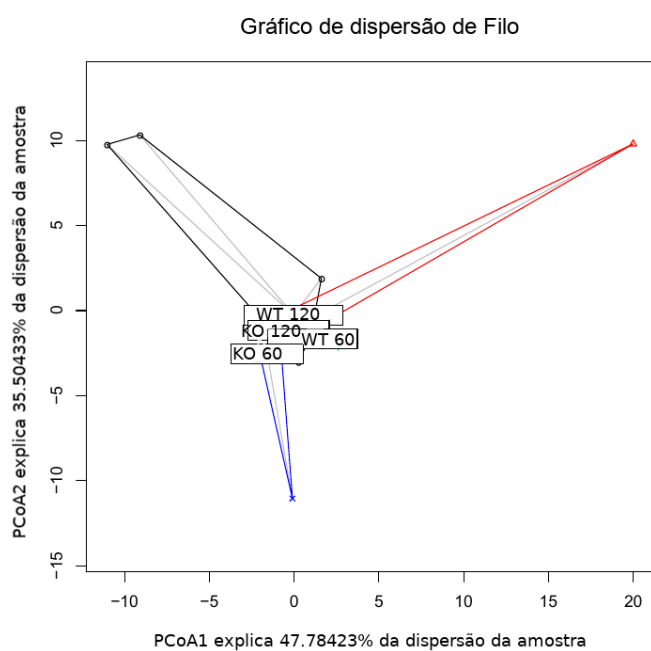


Figura 7: Gráfico de dispersão de coordenadas principais de filo.

A Figura 8 mostra a proporção dos principais filios de importância em cada grupo. As mesmas informações, com as comparações entre os grupos, está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de significância pelo teste estatístico para filo.

Filo	Comparação	Valor de p
<i>Bacteroidia</i>	WT 120 x KO 120	1
	WT 60 x KO 60	0,906
<i>Firmicutes</i>	WT 120 x KO 120	0,775
	WT 60 x KO 60	0,187
<i>Proteobacteria</i>	WT 120 x KO 120	0,396
	WT 60 x KO 60	0,702

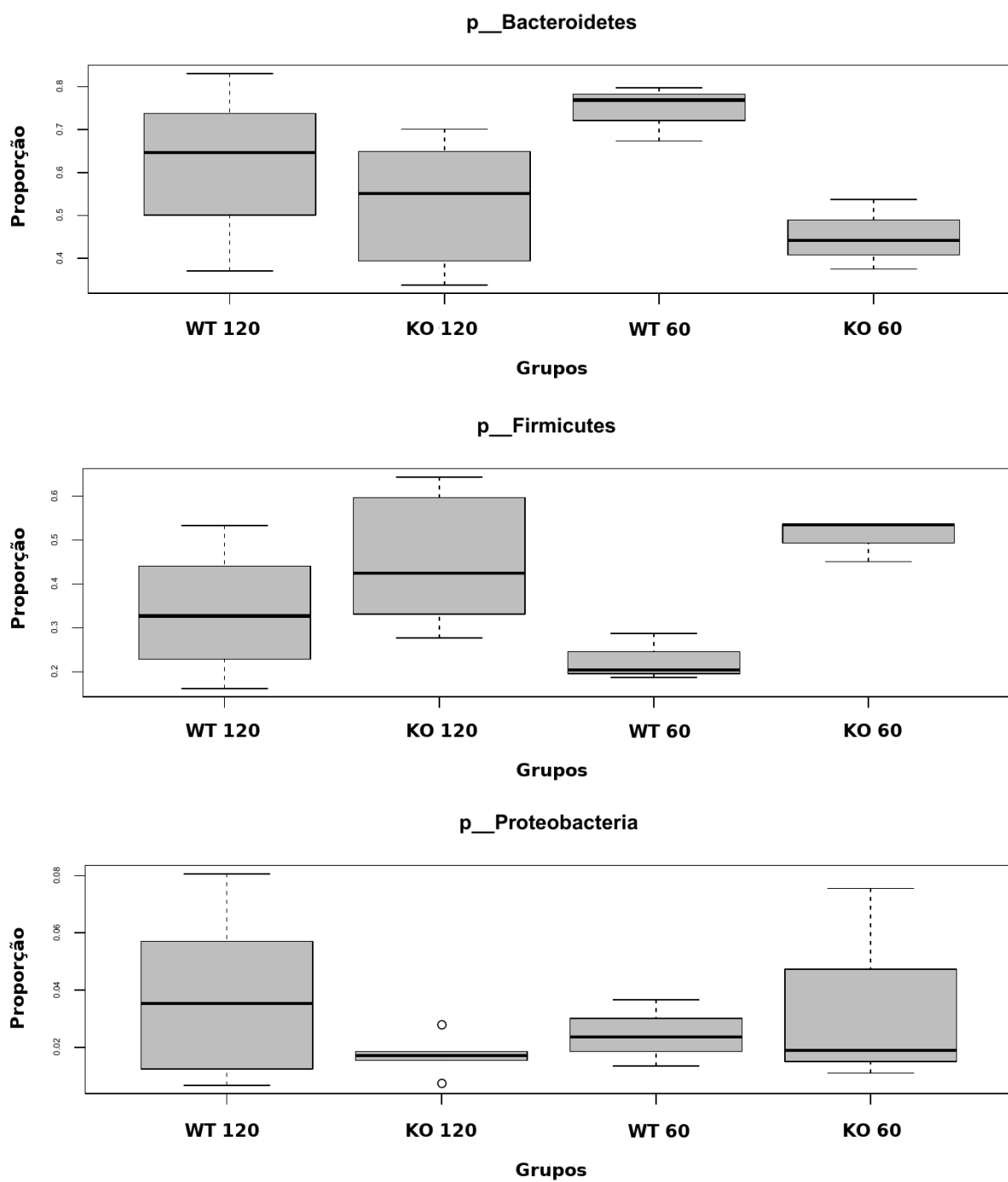


Figura 8: Diagramas de caixa das proporções dos principais filos

4.2.6 Classe

As cinco classes principais encontradas foram *Bacteroidia*, *Clostridia*, *Bacilli*, *Epsilonproteobacteria* e *Betaproteobacteria*. Suas proporções encontradas nos grupos são mostradas na Figura 9.

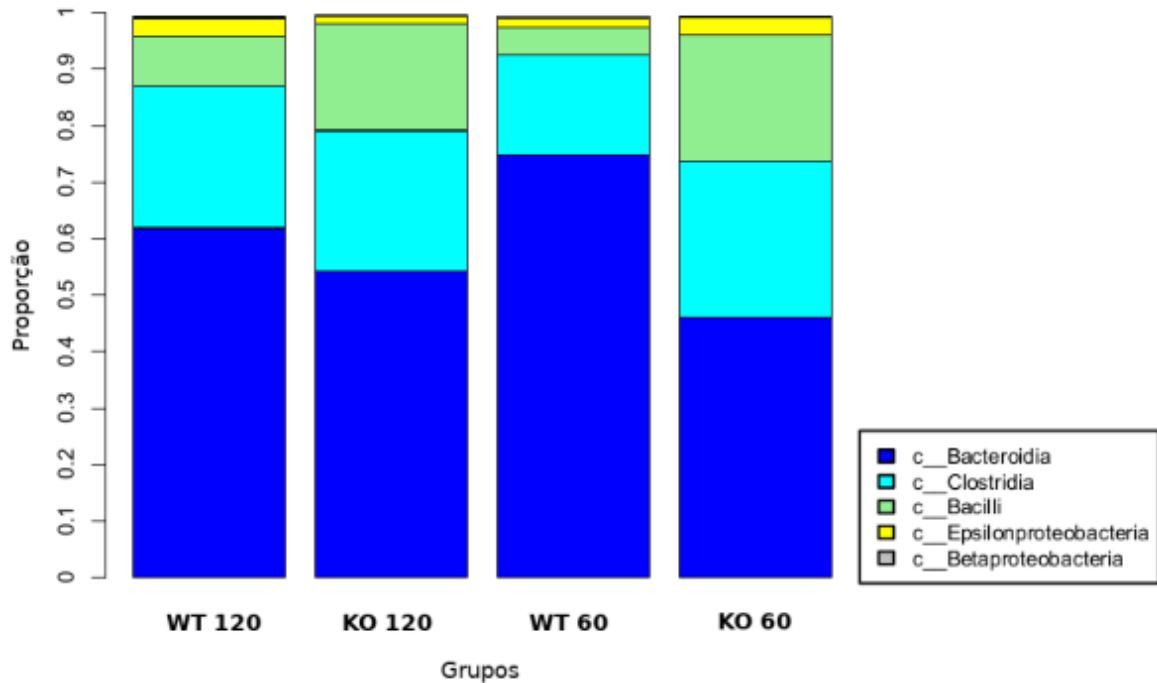


Figura 9: Cinco classes mais representativas.

A Figura 10 mostra como está dispersa entre os grupos a diversidade microbiana a nível de classe. Não há diferença estatisticamente significativa na dispersão ($p = 0,082$).

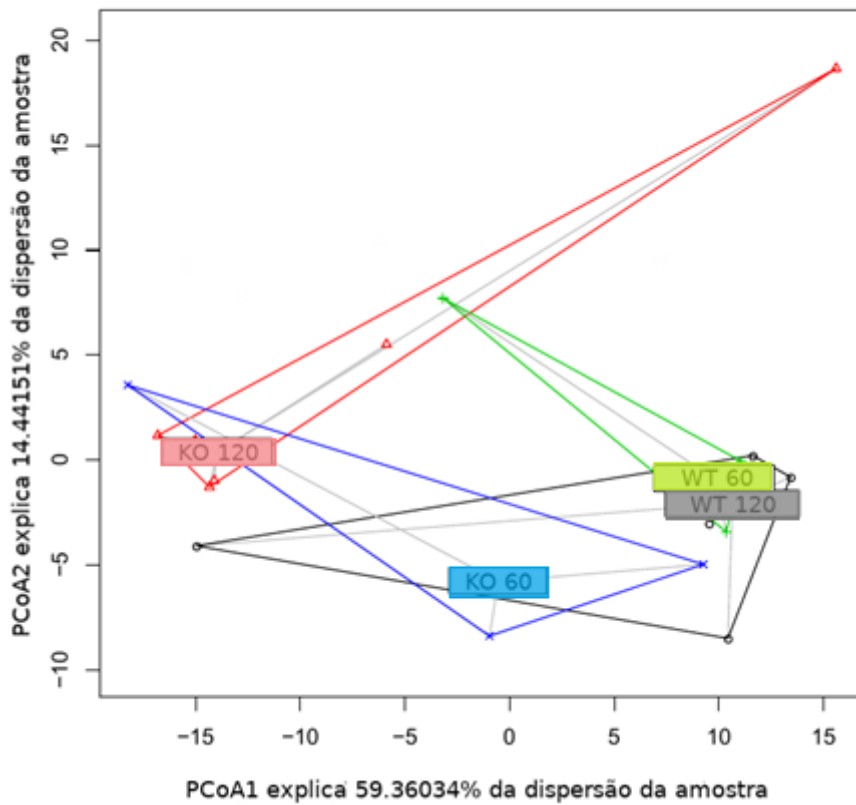


Figura 10: Gráfico de dispersão de classe.

A Figura 11 mostra a proporção das principais classes em cada grupo. As mesmas informações, com as comparações entre os grupos, está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de significância pelo teste estatístico para classe

Filo	Comparação	Valor de p
<i>Bacteroidia</i>	WT 120 x KO 120	0,99
	WT 60 x KO 60	0,99
<i>Clostridia</i>	WT 120 x KO 120	0,95
	WT 60 x KO 60	0,13
<i>Bacilli</i>	WT 120 x KO 120	0,88
	WT 60 x KO 60	0,81

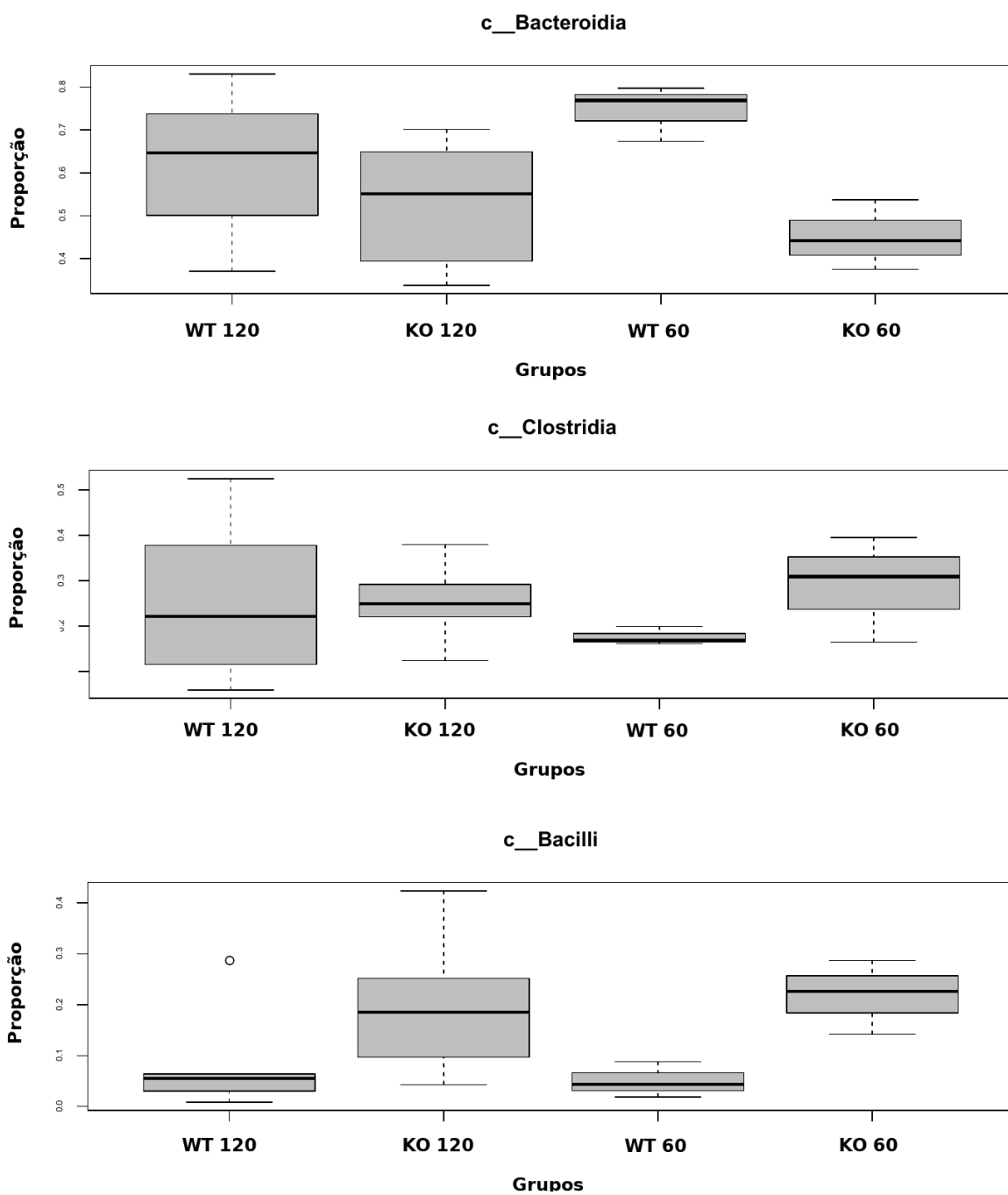


Figura 11: Diagramas de caixa das proporções das primeiras 3 classes mais representativas.

4.1.7 Ordem

As cinco ordens principais encontradas foram *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Lactobacillales*, *Campylobacteriales* e *Burkholderiales*. Suas proporções encontradas nos grupos são mostradas na Figura 12.

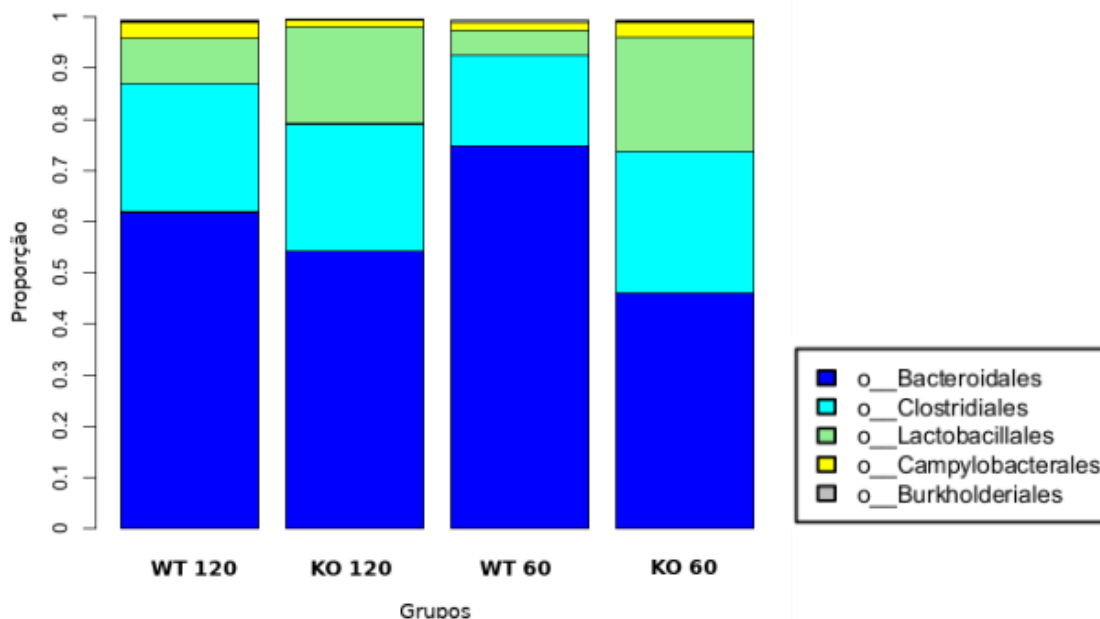


Figura 12: Cinco ordens mais representativas.

A Figura 13 mostra como está dispersa entre os grupos a diversidade microbiana a nível de ordem. Há diferença estatisticamente significativa na dispersão ($p = 0,019$).

A Figura 14 mostra a proporção das três principais ordens de importância em cada grupo. As mesmas informações, com as comparações entre os grupos, está apresentada na Tabela 7. A ordem RF-39 é de interesse por seu valor de p , e sua proporção em nível de ordem, de 11%.

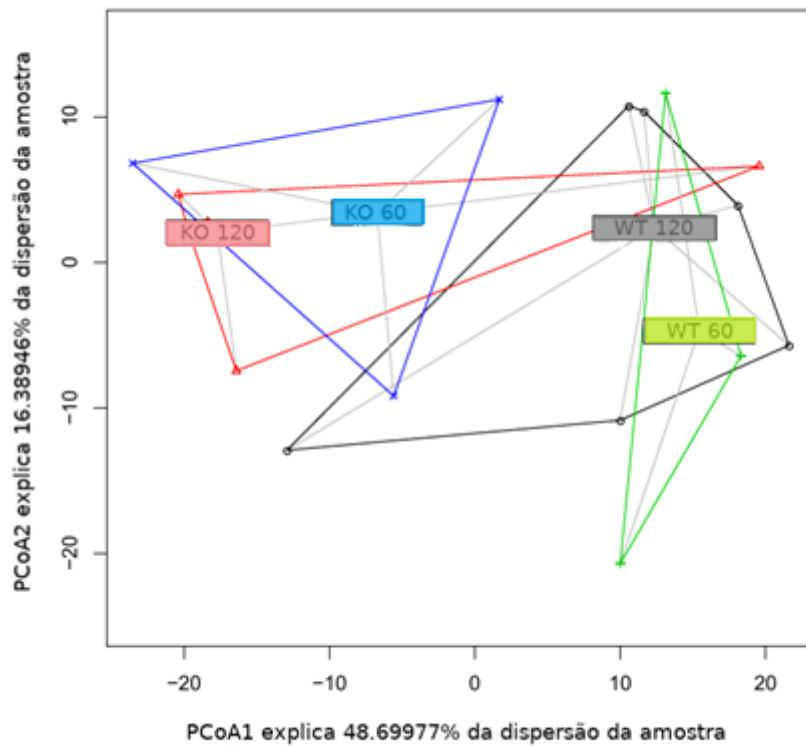


Figura 13: Gráfico de dispersão de ordem.

Tabela 7: Valores de significância pelo teste estatístico para ordem.

Ordem	Comparação	Valor de p
<i>Bacteroidales</i>	WT 120 x KO 120	0,91
	WT 60 x KO 60	0,61
<i>Lactobacilales</i>	WT 120 x KO 120	0,89
	WT 60 x KO 60	0,74
<i>RF-39</i>	WT 120 x KO 120	0,004 *
	WT 60 x KO 60	0,058

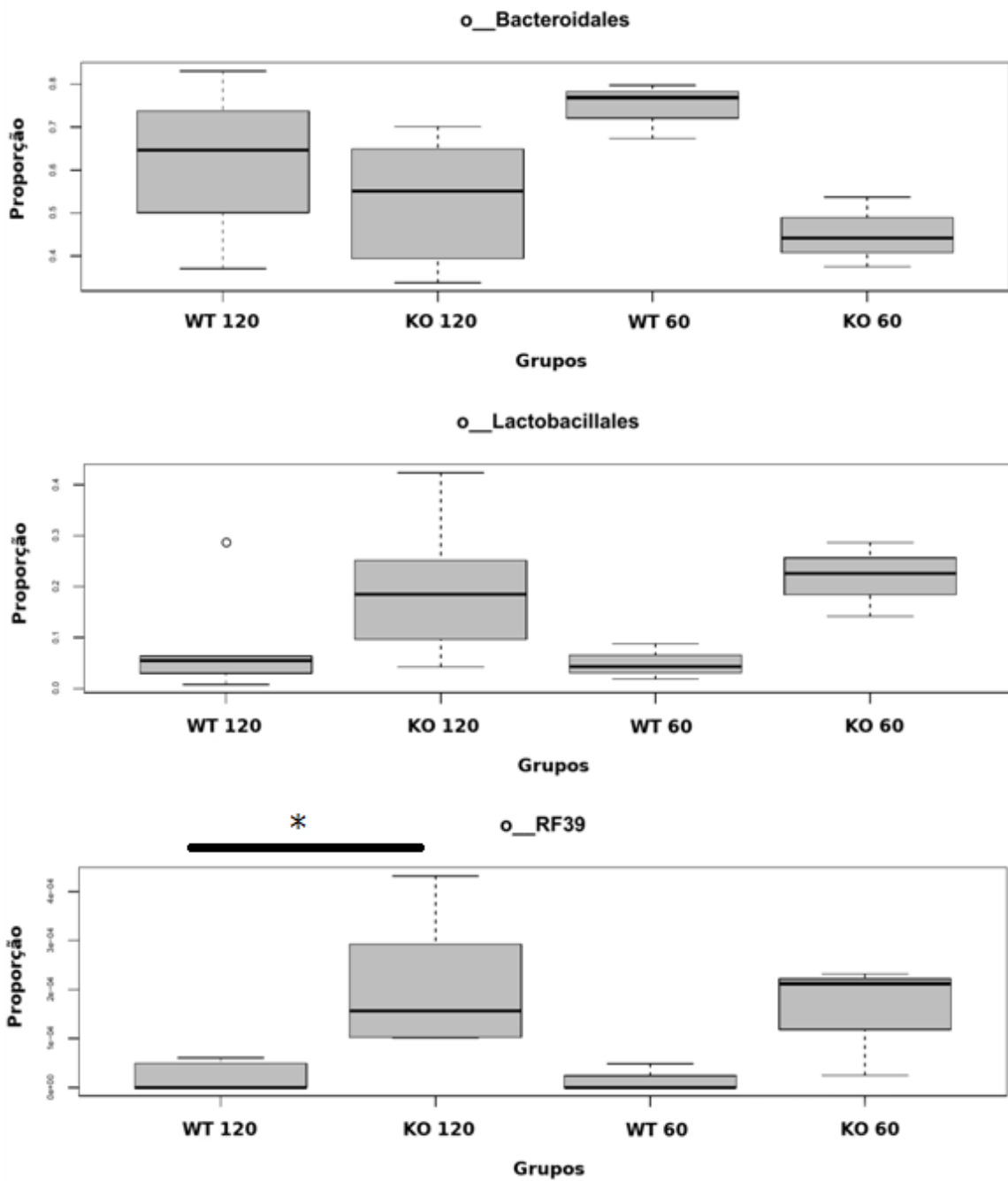


Figura 14: Diagramas de caixa das proporções de algumas ordens.

4.3 MARCAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas de córtex e cerebelo coradas por imunohistoquímica para anti-GFAP foram visualizadas em microscópio óptico. A intensidade de coloração foi avaliada quantitativamente e os dados estão apresentados na Tabela 8. A Figura 15 apresenta cortes representativos entre os grupos. Conforme se pode observar, apesar do aumento da intensidade de coloração nos animais KO, não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 8: Resultados da avaliação da marcação por anti-GFAP.

Grupo	Média (DP)	Valor-p
Córtex WT	0.055 (0.014)	0.082
Córtex KO	0.112 (0.040)	
Cerebelo WT	0.075 (0.028)	0.618
Cerebelo KO	0.008 (0.034)	

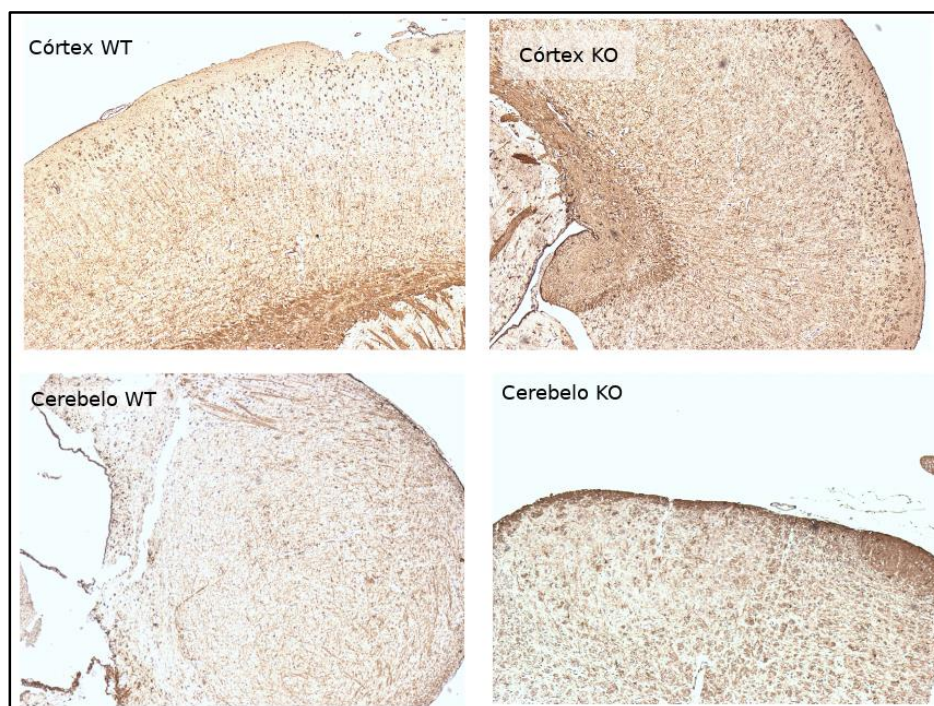


Figura 15: Cortes histológicos de córtex e cerebelo de camundongos KO e WT corados com anti-GFAP.

5 DISCUSSÃO

Cresce cada vez mais o conhecimento sobre a influência dos microrganismos sobre a fisiologia e a sua participação no desenvolvimento das doenças. Alterações nas interações normais têm sido implicadas não apenas em patologias inflamatórias do TGI mas também em distúrbios neuropsiquiátricos. Apesar de pouca relação de causalidade, há algumas correlações entre alteração no microbioma intestinal e o estado patológico em questão. Essas patologias têm um fundo inflamatório e a disbiose favorece a inflamação através de sua interação bidirecional. Assim, aumentam as evidências de que há um papel do microbioma intestinal em doenças onde há inflamação no sistema nervoso central (ROGERS et al, 2016).

Alterações do TGI já foram descritas em pacientes com MPS. Muitos pacientes com MPS I apresentam episódios de fezes moles ou diarreia (WEGRZYN et al, 2005; GIUGLIANI, 2013.). As causas da diarreia ainda não foram elucidadas, mas especula-se que possam estar ligadas a um defeito no sistema nervoso autônomo resultando em motilidade anormal dos intestinos, mas poucas evidências suportam esta hipótese. Um estudo de caso de MPS I relatou episódios de diarreia acompanhados de infecções atípicas do TGI. Durante 3 meses de tratamento com Laronidase não houve episódios de diarreia, sugerindo uma ligação com a doença. Um possível mecanismo sugerido pelos autores é que o acúmulo de GAGs no intestino pode prover um ambiente favorável para o crescimento microbiano, favorável à disbiose. Sugere-se também que o acúmulo poderia causar interferência na produção ou ação da IgA, aumentando a sensibilidade a infecções (WEGRZYN et al, 2005).

O estudo de Giugliani (2013) sobre manifestações gastrointestinais em MPS mostrou que pacientes em uso de TRE mostram menor prevalência de flatulência e distensão abdominal. Foi verificado que pacientes com valores de GAGs urinários normais possuíam significativamente menos episódios de fezes amolecidas que pacientes com GAGs alterados.

No entanto, como já mencionado, estudos sobre a influência da microbiota intestinal em pacientes são de difícil controle em função de hábitos alimentares, condições sanitárias e outros fatores confundidores. Estes confundidores são especialmente relevantes em estudos com menor tamanho amostral, como ocorre no caso de doenças raras. Assim, a possibilidade de utilização de modelos murinos apresenta a vantagem de padronização da alimentação e

das condições de vida, inclusive sanitárias, entre os grupos. Além disso, o mesmo *background* genético permite minimizar fatores individuais de variação, tornando mais fácil estabelecer uma relação de causalidade nas pesquisas com microbioma (NGUYEN et al., 2015).

Apesar disso, nossos resultados não corroboraram a hipótese inicial de que a MPS I teria um efeito prejudicial sobre a microbiota de camundongos. Os dados obtidos neste trabalho permitem apenas sugerir que o ambiente intestinal na MPS I é diferenciado, favorecendo um equilíbrio relativo diferente entre as espécies. Diferentes fatores podem ter contribuído para este resultado, como o acúmulo e excreção alterada de GAGs e seu impacto no equilíbrio inflamatório do indivíduo afetado.

Em primeiro lugar, a curva de rarefação mostra que algumas amostras tiveram uma concentração maior de espécies do que outras, como pode ser visualizado pelas duas do topo, que correspondem aos *pools* de animais com MPS do tempo de 60 dias. A realização de *pools* pode ter juntado ao acaso dois animais que tinham uma grande diversidade e isso pode ter criado extremos nesse tempo de análise. Uma amostra controle de 120 dias ficou muito abaixo das outras, podendo ter ocorrido uma extração inadequada ou amplificação fraca.

Os principais filos encontrados são condizentes com a colonização esperada em camundongos, havendo um predomínio de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as proporções dos filos, ao comparar os grupos em cada tempo, e um cálculo das razão mostrou um aumento não significativo ($p = 0,28$) na razão. Aumento de *Firmicutes* e diminuição de *Bacteroidetes* é relacionado a dietas ricas em gordura e acompanha disbiose e baixa riqueza e também é encontrado em situações patológicas (TURNBAUGH et al., 2006).

O aumento significativo da ordem RF-39 ocorreu nos animais com MPS I. Esta ordem é classificada como pertencente ao filo *Tenericutes*, classe *Mollicutes*. Esta classe está relacionada a dieta obesogênica (TURNBAUGH et al., 2008). Entretanto, esta diferença não se correlacionou com diferenças significativas de peso nos animais, ficando em aberto o significado dessa alteração.

O índice de Simpson mostrou tendência a haver uma menor diversidade no grupo controle ($p = 0,07$) ao comparar o grupo KO 120 com WT 120 por teste Kruskal-Wallis, ao contrário do Índice Shannon. Segundo JOHNSON; BURNET, (2016): o Índice de Shannon é mais sensível à riqueza de espécies, enquanto o Índice de Simpson é mais sensível à uniformidade de espécies.” A riqueza também mostrou tendência a aumento no grupo KO. Pelo Índice Shannon podemos confirmar que o aumento de riqueza é devido ao acaso e ocorre uma diferença na abundância relativa entre os grupos, o que é corroborado pelas métricas de beta-diversidade.

A partir do nível de classe surgem diferenças de abundância relativa na dispersão. Há uma segregação apesar de ainda não estatisticamente significativa, dos grupos controle e afetado. Avançando para o nível de ordem, existe diferença significativa, e um táxon significativo diferenciando os grupos. No entanto, é possível que esta variação não seja maior em função do tempo analisado. Nossos dados foram obtidos aos 120 dias, quando se sabe que este modelo apresenta uma piora do seu quadro clínico a partir dos 6 meses de idade (OHMI et al, 2003). Esse fator pode explicar também a ausência de diferença significativa nos níveis de ativação da micróglia entre os grupos. Finalmente, o pequeno tamanho amostral não pode ser descartado como causa da ausência de variação. Portanto, o experimento poderia ser expandido com mais animais e avaliação aos 180 dias de idade.

A distribuição dos animais em caixas, de acordo com os genótipos, pode ter criado um efeito de atenuação das diferenças de microbiotas em algumas caixas. Em função do tempo de realização do experimento e limitada disponibilidade de fêmeas, animais de mesmo genótipo da mesma ninhada foram utilizados. Uma vez que os camundongos realizam coprofagia, a presença de mais de um animal em uma única caixa e o uso de irmãs da mesma ninhada pode contribuir para uma diluição do efeito do genótipo sobre a microbiota, que pode se confundir com um efeito materno (GOODRICH et al., 2014).

Como perspectiva para o futuro, neste mesmo projeto está prevista a dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta por HPLC. Esta análise pode demonstrar se há uma diferença no perfil de produção metabólica causada pelas diferenças de abundância relativas na composição da microbiota entre esses dois grupos. Inicialmente esta análise estava prevista para ser parte deste projeto, porém o atraso no recebimento dos reagentes postergou o início

das análises. Outra perspectiva é realizar a avaliação das condições gastrointestinais dos animais e relacionar com a exibição de sinais e características da MPS I.

6 CONCLUSÕES

Fomos capazes de verificar que o modelo animal de MPS I apresenta pequenas diferenças em relação ao controle não afetado, em especial em relação à diferença na dispersão da abundância relativa de classes e ordens na microbiota.

Verificamos a maior abundância da ordem RF-39 nos animais MPS I aos 120 dias.

Não foi observada maior marcação com anticorpo GFAP nos animais MPS I de 120 dias, mas isto pode ser devido ao pequeno tamanho amostral (3 animais) analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALNEBERG, Johannes et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nature Methods**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1144-1146, 14 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC.
- ARIEFDJOHAN, Merlin W; A SAVAIANO, Dennis; NAKATSU, Cindy H. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 9, n. 1, 22 maio 2010. Springer Science and Business Media LLC.
- BERCIK, P.; COLLINS, S. M.; VERDU, E. F.. Microbes and the gut-brain axis. **Neurogastroenterology & Motility**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.405-413, 8 mar. 2012. Wiley.
- CAPORASO, J Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.335-336, 11 abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC.
- CLARKE, L.. Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.503-511, 1 abr. 1997. Oxford University Press (OUP).
- COLONETTI, Karina; ROESCH, Luiz Fernando; SCHWARTZ, Ida Vanessa Doederlein. The microbiome and inborn errors of metabolism: Why we should look carefully at their interplay?. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 41, n. 3, p.515-532, set. 2018. FapUNIFESP (SciELO).
- CRYAN, John F.; DINAN, Timothy G.. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 13, n. 10, p.701-712, 12 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC.
- DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F.. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. **Gastroenterology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.77-89, mar. 2017. Elsevier BV.
- ERNY, Daniel et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. **Nature Neuroscience**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.965-977, 1 jun. 2015. Springer Nature.
- ESCOBAR-ZEPEDA, Alejandra; LEÓN, Arturo Vera-ponce de; SANCHEZ-FLORES, Alejandro. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. **Frontiers In Genetics**, [s.l.], v. 6, 17 dez. 2015. Frontiers Media SA.

- FEDERHEN, Andressa et al. Estimated birth prevalence of mucopolysaccharidoses in Brazil. **American Journal Of Medical Genetics Part A**, [s.l.], v. 182, n. 3, p.469-483, 11 jan. 2020. Wiley.
- GARCIA-RIVERA, Mayra F. et al. Characterization of an immunodeficient mouse model of mucopolysaccharidosis type I suitable for preclinical testing of human stem cell and gene therapy. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 74, n. 6, p.429-438, nov. 2007. Elsevier BV.
- GIUGLIANI, Luciana. **Estudo sobre as Manifestações Gastrointestinais em Pacientes com Mucopolissacaridoses**. 2013. 171 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- GIUGLIANI, Roberto et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: brief review and guidelines for treatment. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.589-604, 12 nov. 2010.
- GOODRICH, Julia k. et al. Conducting a Microbiome Study. **Cell**, [s.l.], v. 158, n. 2, p.250-262, jul. 2014. Elsevier BV.
- HASKINS, Mark e et al. Alpha-L-iduronidase Deficiency in a Cat: A Model of Mucopolysaccharidosis I. **Pediatric Research**, [s.l.], v. 13, n. 11, p.1294-1297, nov. 1979. Springer Science and Business Media LLC.
- HEALEY, Adam et al. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. **Plant Methods**, [s.l.], v. 10, n. 1, 2014. Springer Science and Business Media LLC.
- JOHNSON, Katerina V.-a.; BURNET, Philip W. J.. Microbiome: Should we diversify from diversity?. **Gut Microbes**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.455-458, 10 out. 2016. Informa UK Limited.
- KELLY, John R. et al. Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. **Frontiers In Neuroscience**, [s.l.], v. 11, 15 set. 2017. Frontiers Media SA.
- KHAN, Shaukat A. et al. Epidemiology of mucopolysaccharidoses. **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 121, n. 3, p.227-240, jul. 2017. Elsevier BV.
- KIM, Dorothy et al. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. **Microbiome**, [s.l.], v. 5, n. 1, 5 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC.
- KUMAR, Ranjit et al. Getting Started with Microbiome Analysis: Sample Acquisition to Bioinformatics. **Current Protocols In Human Genetics**, [s.l.], v. 82, n. 1, jul. 2014. Wiley.

- KUNIN, V. et al. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 72, n. 4, p.557-578, 1 dez. 2008. American Society for Microbiology.
- MOHAJERI, M. Hasan et al. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. **European Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.1-14, maio 2018. Springer Science and Business Media LLC.
- MOUSE GENOME DATABASE -Idua tm1Efn , The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. 2018. Disponível em;<http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:2651471>). Acesso em 23 de Agosto de 2018.
- NEUFELD, E. F., MUENZER J.. The Mucopolysaccharidoses. In: VALLE, D. et al. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease New York, NY: McGraw-Hill; 2014. Disponível em <<http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=971§ionid=62642135>>. Acessado em 22 de agosto de 2018.
- NGUYEN, T. L. A. et al. How informative is the mouse for human gut microbiota research? **Disease Models & Mechanisms**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-16, 1 jan. 2015. The Company of Biologists.
- OHMI, K. et al. Activated micróglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIB. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 100, n. 4, p.1902-1907, 7 fev. 2003. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- OMIM®, Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. Número MIM: {607014}: Disponível em: <<https://www.omim.org/entry/607014>>. 2002, atualizado em 30/05/2018. Acesso em 30 de outubro de 2019.
- PYLRO, Victor S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 107, p.30-37, dez. 2014. Elsevier BV.
- R CORE TEAM (2017) **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2020.
- ROGERS, G B et al. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.738-748, 19 abr. 2016. Springer Nature.
- SAWIN, Emily A. et al. Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice. *American Journal Of Physiology-gastrointestinal And Liver Physiology*, [s.l.], v. 309, n. 7, p.590-601, out. 2015. American Physiological Society.

- SELBER-HNATWI, Susannah et al. Human Gut Microbiota: Toward an Ecology of Disease. *Frontiers In Microbiology*, [s.l.], v. 8, 17 jul. 2017. Frontiers Media SA.
- SPELLACY, E. et al. A canine model of human alpha-L-iduronidase deficiency. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 80, n. 19, p.6091-6095, 1 out. 1983. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- TURNBAUGH, Peter J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, [s.l.], v. 444, n. 7122, p.1027-1031, dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC.
- _____. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host & Microbe*, [s.l.], v. 3, n. 4, p.213-223, abr. 2008. Elsevier BV.
- VERA, Luisa Natalia Pimentel; BALDO, Guilherme. The potential of gene therapy for mucopolysaccharidosis type I. **Expert Opinion On Orphan Drugs**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.33-41, 2 jan. 2020. Informa UK Limited.
- WANG, Dan et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 99, n. 1, p.62-71, jan. 2010. Elsevier BV.
- WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R.. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied And Environmental Microbiology*, [s.l.], v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 22 jun. 2007. American Society for Microbiology
- WANG, Yan; KASPER, Lloyd H.. The role of microbiome in central nervous system disorders. **Brain, Behavior, And Immunity**, [s.l.], v. 38, p.1-12, maio 2014. Elsevier BV.
- WEGRZYN, Grzegorz et al. Atypical microbial infections of digestive tract may contribute to diarrhea in mucopolysaccharidosis patients: a MPS I case study. **Bmc Pediatrics**, [s.l.], v. 5, n. 1, 9 maio 2005. Springer Nature.