MARCELA DE SOUZA BASQUEIRA

Estudo da microbiota de pacientes portadores de doença de Chagas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2018**

MARCELA DE SOUZA BASQUEIRA

Estudo da microbiota de pacientes portadores de doença de Chagas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Basqueira, Marcela de Souza
Estudo da microbiota de pacientes portadores de
doença de Chagas / Marcela de Souza Basqueira. --
São Paulo, 2018.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Ester Cerdeira Sabino.

Descritores: 1. Doença de Chagas 2. Microbiota
3. Microbioma gastrointestinal 4. Sequenciamento de
nova geração 5. RNA ribossômico 16S

USP/FM/DBD-210/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido Ricardo por todo amor, paciência e companheirismo ao longo dos anos em que me dediquei à este trabalho. Aos meus pais Célia e Sérgio e à minha irmã Juliana por todo apoio e incentivo que me deram durante toda a minha vida. Sem vocês eu jamais teria conseguido.

Agradecimentos

À minha orientadora profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino, pela grande oportunidade da realização do meu doutorado. Por todo ensinamento, apoio, paciência, amizade e por toda dedicação atribuída a cada etapa desse trabalho. O meu imenso e eterno agradecimento.

À Dra. Marcia Mayer meus profundos agradecimentos por toda colaboração para o aprimoramento dessa tese.

Ao meu marido Ricardo Pelegrini Basqueira por estar sempre ao meu lado, não medindo esforços para me apoiar e me incentivar no meu desenvolvimento profissional e pessoal. Por toda ajuda na elaboração desta tese, pelo amor, companheirismo e paciência nos momentos que mais precisei.

Aos meus pais Sérgio Luiz de Souza e Célia Regina Remp, pelos valores passados durante a minha criação, pelo incondicional amor e incessante estímulo.

À minha irmã Juliana Remp de Souza por todo incentivo e carinho.

À minha querida amiga e funcionária do Laboratório de Parasitologia Médica (LIM 46) Léa Campos de Oliveira, por todo apoio, incentivo e colaboração para o desenvolvimento dessa tese.

À toda equipe do Laboratório de Investigação Médica (LIM 46), pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto e pela amizade, em especial à Roberto Marques Ribeiro, Carlos Henrique Valente Moreira e Erika Manuli.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Micheli Medeiros, Roberta Cristina Ruedas Martins, Flávia Salles, Natália Bueno, Ingra Morales, Camila Cruz de

Martino, Ana Paula Marchi, Juliana Januário e Camila Rizeki, por toda colaboração na realização desse projeto, pela amizade e pelas palavras de carinho.

À Roseli dos Santos e Andreia De Paula Alcaia por terem me ajudado inúmeras vezes com a parte burocrática da tese e por todo carinho e amizade.

À equipe da Fundação da Faculdade de Medicina, que não mediram esforços para a coleta das amostras dos pacientes envolvidos neste estudo, meu muito obrigado.

Às professoras Dra. Silvia Figueiredo Costa, Dra. Anna Sara Shafferman Levin e a toda equipe do laboratório de Investigação Médica (LIM 54), pela colaboração, apoio e incentivo na realização desse projeto.

À minha querida amiga e professora Cristina Felicissimo por toda revisão e correção gramatical dessa tese e por todo carinho.

À CAPES e ao CNPQ meu muitíssimo obrigada pelo auxílio financeiro, o qual foi fundamental para que esse trabalho fosse desenvolvido.

"Algo só é impossível até que alguém
duvide e resolva provar o contrário."

Albert Einstein

Sumário

Lista de siglas e abreviaturas	i
Lista de tabelas	iii
Lista de figuras	vi
Resumo	x
Summary / Abstract	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Doença de chagas	1
1.2. Transmissão da doença de Chagas	2
1.3. Patogenia da doença de Chagas.....	4
1.4. Fisiopatologia da doença de Chagas	6
1.4.1. Desautonomia cardíaca	6
1.4.2. Distúrbios microvasculares	7
1.4.3. Danos ao miocárdio causado pelo parasito	8
1.4.4. Lesão no miocárdio mediada pelo sistema imune	8
1.4.5. Sistema imune na doença de Chagas	9
1.5. Microbiota intestinal.....	10

1.6.	Desenvolvimento da microbiota intestinal	12
1.7.	Disbiose da microbiota intestinal	13
1.8.	Tecnologias de sequenciamento de nova geração para análise da microbiota	15
1.9.	Microbiota e doença de Chagas.....	17
2.	Objetivo	18
3.	Casuística e métodos	19
3.1.	Período do estudo	19
3.2.	Desenho do estudo.....	19
3.3.	Caracterização do local de estudo	19
3.4.	População de estudo e seleção da casuística	19
3.4.1.	Seleção dos casos	19
3.4.2.	Definição dos grupos de sujeitos estudados de acordo com cada forma clínica da Doença de Chagas.....	20
3.4.3.	Critérios de inclusão	21
3.4.4.	Critérios de exclusão.....	21
3.4.5.	Dados epidemiológicos e clínicos.....	21
3.5.	Coleta de amostras.....	21
3.6.	Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)	22

3.7.	Sequenciamento de Nova Geração	23
3.7.1.	Amplificação de sequências-alvo	24
3.7.2.	Purificação da biblioteca	24
3.7.3.	Preparo do pool equimolar das bibliotecas amplificados	25
3.7.4.	PCR em emulsão	26
3.7.4.1.	Preparo da solução de amplificação	26
3.7.4.2.	Enriquecimento	26
3.7.4.3.	Solução Melt-Off	27
3.7.4.4.	Preenchimento da tira da reação de enriquecimento	27
3.7.5.	Reação de sequenciamento	28
3.8.	Análise dos resultados	28
3.8.1.	Análise dos dados clínicos e epidemiológicos	28
3.8.2.	Análise do sequenciamento	29
4.	Resultados	32
4.1.	População do estudo	32
4.2.	Análise do grupo controle vs forma indeterminada	33
4.2.1.	Análise da taxa de abundância relativa	36

4.3.	Análise do grupo controle vs forma cardíaca	43
4.3.1.	Análise da taxa de abundância relativa	45
4.4.	Análise do grupo controle vs Megacólon	53
4.4.1.	Análise da taxa de abundância relativa	55
4.5.	Análise do microbioma nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas: indeterminada, cardíaca, megacólon e de controles saudáveis.	62
4.5.1.	Análise da taxa de abundância relativa	64
4.	Discussão.....	76
5.	Conclusões	84
7.	Anexos.....	85
8.	Referências Bibliográficas	98

Lista de siglas e abreviaturas

CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CU	Colite ulcerativa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Método imunoenzimático
GI	Trato gastrointestinal
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC-FMUSP	Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido clorídrico
IMC	Índice de massa corpórea
INS	Instituto Nacional de Saúde
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPS	Lipopolisacarídeos
NGS	Sequenciamento de nova geração

OMS	Organização Mundial da Saúde
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
PCR	Reação em cadeia polimerase
PCoA	Análise de coordenadas principais
PGM	<i>Ion Torrent Personal Genome Machine</i>
PMH	Projeto do Microbioma Humano
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rRna	Ácido ribonucleico ribossomal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TE	Tris / Ácido clorídrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α

Lista de tabelas

Tabela 1 - Características epidemiológicas e clínicas dos 104 pacientes portadores da doença de Chagas e controles.....	32
Tabela 2 - Estimativa da diversidade alfa entre o grupo controle e a forma indeterminada da doença de Chagas.	34
Tabela 3 - Abundância relativa de Bacteria em nível de filo de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).....	36
Tabela 4 - Abundância relativa de Bacteria em nível de classe de amostras de fezes de pacientes do grupo de controle e da forma indeterminada. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).	37
Tabela 5 - Abundância relativa de Bacteria em nível de família de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).	39
Tabela 6 - Abundância relativa de Bacteria em nível de gênero de amostras de fezes de pacientes do grupo de controle e da forma indeterminada. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).	41
Tabela 7 - Estimativa da diversidade alfa entre o grupo controle e a forma cardíaca da doença de Chagas.	44
Tabela 8 - Abundância relativa de Bacteria em nível de filo de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).....	46
Tabela 9 - Abundância relativa de Bacteria em nível de classe de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).....	47

Tabela 10 - Abundância relativa de Bacteria em nível de família de amostras de fezes de pacientes do grupo de controle e da forma cardíaca. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).....	49
Tabela 11 - Abundância relativa de Bacteria em nível de gênero de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).....	51
Tabela 12 - Estimativa da diversidade alfa entre o grupo controle e a forma de megacólon da doença de Chagas.	54
Tabela 13 - Abundância relativa de Bacteria em nível de filo de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma de megacólon. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).....	56
Tabela 14 - Abundância relativa de Bacteria em nível de classe de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma de megacólon. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).	57
Tabela 15 - Abundância relativa de Bacteria em nível de família de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma de megacólon. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).	58
Tabela 16 - Abundância relativa de Bacteria em nível de gênero de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma de megacólon. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).	60
Tabela 17 - Estimativa da diversidade alfa entre o grupo controle e as formas indeterminada, cardíaca e megacólon.	63
Tabela 18 - Abundância relativa de Bacteria em nível de filo de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e das formas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).....	65
Tabela 19 - Abundância relativa de Bacteria em nível de classe de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e das formas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas. *Diferença estatisticamente significativa $*p<0,05$ (Mann Withney).	67

Tabela 20 - Abundância relativa de Bacteria em nível de família de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e das formas clínicas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas.

*Diferença estatisticamente significativa $*p < 0,05$ (Mann Withney). 69

Tabela 21 - Abundância relativa de Bacteria em nível de gênero de amostras de fezes de pacientes do grupo de controle e das formas clínicas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas.

*Diferença estatisticamente significativa $*p < 0,05$ (Mann Withney). 72

Lista de figuras

Figura 1 - Prevalência estimada de infecções por <i>Trypanosoma cruzi</i> no continente americano.....	2
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 3 - Curvas de rarefação demonstrando o número estimado de OTUs na forma indeterminada e controle, em função do esforço de sequenciamento gerado através da plataforma QIIME.	34
Figura 4 - Análise da comunidade bacteriana nas amostras de fezes pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ponderada (a) e não ponderada (b) nos grupos controles e forma indeterminada.	35
Figura 5 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de filo em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e indeterminado.	36
Figura 6 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de classe em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada.	38
Figura 7 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de família em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada.	40
Figura 8 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada.	42

Figura 9 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes controles e da forma indeterminada.	42
Figura 10 - Análise da comunidade bacteriana nas amostras de fezes pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ponderada (a) e não ponderada (b) no grupo controle e na forma indeterminada.	45
Figura 11 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de filo em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca.....	46
Figura 12 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de classe em amostras fecais obtidas de pacientes controle e da forma cardíaca.	48
Figura 13 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria a em nível de família em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca. ...	50
Figura 14 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca.....	52
Figura 15 - Curvas de rarefação demonstrando o número estimado de OTUs no grupo controle e na forma de megacólon em função do esforço de sequenciamento gerado através da plataforma QIIME.....	53
Figura 16 - Análise da comunidade bacteriana nas amostras de fezes pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ponderada (a) e não ponderada (b) na forma de megacólon e controle.....	55

Figura 17 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de filo em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma megacólon.	56
Figura 18 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de classe em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma megacólon.	57
Figura 19 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de família em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma megacólon.	59
Figura 20 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma megacólon.	61
Figura 21 - Curvas de rarefação demonstrando o número estimado de OTUs no grupo controle e nas formas indeterminada, cardíaca e megacólon em função do esforço de sequenciamento gerado através da plataforma QIIME.....	62
Figura 22 - Análise da comunidade bacteriana nas amostras de fezes pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ponderada (a) e não ponderada (b) no grupo controle e nas formas indeterminada, cardíaca e megacólon.	64
Figura 23 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de filo em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e das formas indeterminada, cardíaca e megacólon.....	66
Figura 24 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de classe em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e das formas indeterminada, cardíaca e megacólon.....	68

Figura 25 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de família em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e das formas clínicas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas. 71

Figura 26 - Abundância relativa e classificação taxonômica de bactéria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e das formas clínicas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas. 74

Resumo

Basqueira MS. *Estudo da microbiota de pacientes portadores de doença de Chagas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e ainda hoje representa um grande problema de saúde pública tendo infectado mais de oito milhões de pessoas. A patogênese da cardiomiopatia chagásica ainda não é completamente compreendida. A inflamação no miocárdio é intensa em relação ao número de parasitos presentes e também se observa um dano progressivo em outros órgãos como esôfago e cólon em 30% a 40% dos casos em que se diagnosticou a doença. Alguns estudos começaram a mostrar que a resposta imunológica a um parasita pode depender da microbiota intestinal; porém, ainda não existem estudos com a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) que descrevam a microbiota intestinal em doença de Chagas. É possível que uma pequena alteração do peristaltismo intestinal, decorrente da infecção por *T. cruzi* possa alterar a colonização de algumas bactérias as quais podem causar mudanças na reatividade do sistema imune como aumentar a resposta autoimune, gerando maior dano ao coração. **OBJETIVO:** Este trabalho objetivou descrever a microbiota intestinal de acordo com a forma clínica da doença de Chagas, através da amplificação do gene 16s RNA ribossomal e avaliar seu papel na patogênese da doença. **METODO:** Foram selecionados 114 indivíduos, sendo 30 portadores da forma cardíaca da doença, 11 com a forma digestiva (megacólon), 32 com a indeterminada e 31 indivíduos saudáveis (controles). De cada um deles, foram coletadas amostras de fezes para a análise da microbiota por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração *Ion Torrent*. Os resultados obtidos foram analisados pelo software QIIME para determinar a população de bactérias presentes nas amostras. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U-test. **RESULTADOS:** A frequência relativa do filo Verucomicrobia foi significativamente menor no grupo cardíaco em comparação ao grupo controle e as outras formas clínicas: indeterminada e digestiva. Apesar da abundância relativa desse filo ser menor do que 1%, a diferença observada se manteve significativa, mesmo após a correção de Bonferroni. **CONCLUSÕES:** Nosso estudo sugere que uma menor proporção do filo Verrucomicrobia possa estar relacionada ao processo inflamatório na forma cardíaca; porém, ainda pouco se conhece sobre este grupo de bactérias e seus componentes, que nos permita afirmar o seu efetivo papel na forma cardíaca da doença de Chagas.

DESCRIPTORIOS: doença de Chagas; microbiota; microbioma gastrointestinal; sequenciamento de nova geração; RNA ribossômico 16S.

Summary / Abstract

Basqueira MS. *Study of the microbiota of patients with Chagas disease* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

INTRODUCTION: Chagas disease is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and still represents a major public health problem with more than eight million people infected. Chagas cardiomyopathy pathogenesis is still not completely understood. Inflammation in the myocardium is intense in relation to the number of parasites present and progressive damage is also observed in other organs such as the esophagus and colon in 30% to 40% of the cases. Some studies are beginning to show that the immune response to a parasite may depend on the intestinal microbiota. However, there are no studies using NGS technology that describes the intestinal microbiota of Chagas disease. It is possible that a small change in intestinal peristalsis due to *T. cruzi* infection may alter the colonization of some bacteria. These changes could cause changes in the reactivity of the immune system such as increasing the autoimmune response causing greater damage to the heart. **OBJECTIVE:** This study aimed to describe the intestinal microbiota according to the clinical form of Chagas disease, through amplification of the 16s ribosomal RNA gene and to evaluate its role in the pathogenesis of the disease. **METHODS:** A total of 114 individuals were selected, 30 of cardiac form of the disease, 11 with the digestive form (megacolon), 32 with indeterminate form and 31 healthy individuals (controls). Stool samples were collected and analysed for the microbiota using Ion Torrent sequencing technique. The results were analyzed by the QIIME software to determine the population of bacteria present in the samples. Statistical was performed using Kruskal-Wallis non-parametric test and Mann-Whitney U-test. **RESULTS:** The relative frequency of the Verrucomicrobia phylum was significantly lower among the cardiac group when compared to control, indeterminate and digestive form. Our study suggest that the phylum Verrucomicrobia may play a role in the miocardio inflammation process in Chagas disease, however little is known about these bacteria to infer the mechanism.

Descriptors: Chagas disease; microbiota; gastrointestinal microbiome; new generation sequencing; RNA ribosomal 16S.

1. Introdução

1.1. Doença de chagas

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase americana, foi descoberta em 1909 pelo médico e cientista brasileiro Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas e é uma antroponose característica do continente americano.^{1, 2} Ela é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e ainda hoje representa um grande problema de saúde pública com mais de oito milhões de pessoas infectadas somente na América Latina, sendo o Brasil um dos três países com maior número de infectados: aproximadamente 1,2 milhão de pessoas.³ No entanto, devido principalmente ao fenômeno migratório, é possível encontrar portadores da doença de Chagas em localidades não-endêmicas como Estados Unidos, Europa e Ásia.⁴

Segundo estimativas da organização mundial da saúde (OMS) para o ano de 2010, os infectados pela doença de Chagas representam, em média, de 0,1% a 0,9% da população dos países latino-americanos sendo que na Argentina e na Bolívia este valor chega a ser maior que 3,0%, conforme apresentado na Figura 1.⁵

Figura 1 - Prevalência estimada de infecções por *Trypanosoma cruzi* no continente americano

FONTE - Bern et al.⁵

1.2. Transmissão da doença de Chagas

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer de formas distintas, sendo a mais comum o contato com fezes infectadas de um inseto hematófago vetor após o repasto sanguíneo (via vetorial). Porém, essa transmissão também ocorre por via placentária ou

periparto (vertical), por meio de transfusão sanguínea, por órgãos transplantados e por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados.^{1, 2, 5}

Na transmissão por via vetorial, um inseto hematófago (triatomíneo) ingere formas tripomastigotas do *T. cruzi* durante o repasto sanguíneo com mamíferos infectados. Uma vez dentro do estômago deste triatomíneo, o tripanosoma sofre as primeiras transformações, formando-se, no intestino médio, as formas epimastigotas que irão se multiplicar e migrar para o intestino posterior no qual essas formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que é a forma do *T. cruzi* capaz de infectar mamíferos. Este ciclo completo demora, em geral, de duas a quatro semanas.⁵

Quando o inseto infectado defecar durante um próximo repasto sanguíneo, parasitos são depositados e as formas tripomastigotas metacíclicas penetram no hospedeiro através da lesão da picada. No interior das células hospedeiras, formas amastigotas (replicativas) serão formadas e, após vários ciclos de multiplicações, transformam-se em tripomastigotas, rompendo essas células e liberando os parasitos na corrente sanguínea. Quando um outro triatomíneo picar o hospedeiro infectado, o ciclo se reiniciará.⁵

Figura 2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

FONTE - Adaptado de Bern et al.⁵

1.3. Patogenia da doença de Chagas

A fase aguda da doença dura aproximadamente de seis a oito semanas. Na maioria dos casos, é assintomática, mas apresenta positividade nos exames sorológicos, além de uma alta parasitemia. Já na forma sintomática, os infectados costumam apresentar alguns sinais conhecidos como Romanã quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva ou Chagoma quando ocorre a penetração pela pele;^{1,6} no entanto, também podem apresentar febre, dor de cabeça, dores musculares, abdominais, inchaço nas pernas e rosto, dificuldade de respirar entre outros e, em 5 a 10% dos casos, meningoencefalite e miocardite aguda.⁷

Caso não tratada adequadamente, a fase aguda pode progredir para a indeterminada, que é a crônica assintomática ou crônica sintomática.

A fase indeterminada é desenvolvida em 60% a 70% dos casos e pode durar de dez a trinta anos. Caracteriza-se por ausência de sintomas nos resultados dos exames de raio-X do coração, do esôfago e do cólon, os quais mostram resultados normais e ausência de alterações eletrocardiográficas, porém com positividade em exames sorológicos e moleculares.^{6, 8}

Cerca de 50% dos casos com a forma indeterminada evoluem para a crônica sintomática, que se divide em cardíaca (30%), digestiva (15%) ou ambas (5%).^{6, 7}

A forma cardíaca é tipicamente caracterizada por uma dilatação das câmaras do coração, miocardite, hipertrofia, fibrose, arritmias com tromboembolismo podendo levar à morte súbita;^{6, 8, 9} já a digestiva, é representada principalmente por alterações nos movimentos peristálticos do esôfago e cólon devido à destruição dos gânglios do sistema nervoso autônomo localizados na região mesentérica, ocasionando megaesôfago e o megacólon.^{1, 6}

A maioria dos casos de megaesôfago acomete homens com idade entre vinte e quarenta anos, sendo os principais sintomas: disfagia, odinofagia, dor retroesternal, regurgitação, pirose, soluço, tosse e sialose. O megacólon surge depois do megaesôfago e compreende as dilatações dos cólons sigmoide e reto. Acomete principalmente homens com idade entre trinta e quarenta anos, tem como principal sintoma a constipação intestinal e as complicações mais graves são obstrução intestinal e a perfuração que pode levar a peritonite.¹

Outra forma é a cardiodigestiva que combina sintomas das duas anteriores; na maioria dos casos, o megaesôfago precede os danos cardíacos e o megacólon, sendo essa a menos frequente.^{6, 10}

O diagnóstico da forma crônica da doença é baseado em técnicas sorológicas principalmente pelo método imunoenzimático (ELISA). A detecção do parasita é usada apenas no diagnóstico da fase aguda pelas técnicas reação em cadeia polimerase (PCR) ou visualização direta no creme leucocitário.¹¹⁻¹³

1.4. Fisiopatologia da doença de Chagas

A patogênese da cardiomiopatia chagásica ainda não é completamente compreendida, não se sabendo ao certo como ocorre a interação do complexo parasita-hospedeiro. A inflamação no miocárdio é intensa pelo número de parasitos presentes e também se observa um dano progressivo em outros órgãos como esôfago e cólon em 30% a 40% dos casos.^{14, 15} Estudos realizados em modelos animais e em humanos apontaram quatro principais mecanismos que foram sistematizados por Martin-Neto et al.¹⁶, desautonomia cardíaca, distúrbios microvasculares, danos no miocárdio relacionado diretamente à presença do parasito e autoimunidade.¹⁷

1.4.1. Desautonomia cardíaca

A desautonomia cardíaca foi uma das primeiras teorias para tentar explicar as síndromes clínicas de megaesôfago, megacólon e falha cardíaca. Evidências dessa teoria foram demonstradas em 1950, em um estudo conduzido pelo pesquisador alemão Fritz Köberle, em que se observou uma intensa despopulação neuronal parassimpática em pacientes chagásicos, acreditando ser este o principal mecanismo da cardiomegalia e

enteromegalia. Esta despopulação neuronal também foi observada em pacientes com megaesôfago e megacólon e o aperistaltismo causado é geralmente considerado o principal mecanismo envolvido na patogênese da forma digestiva da doença de Chagas.^{17, 18}

Posteriormente, outros estudos baseados no de Köberle foram realizados corroborando com os achados deste pesquisador.^{19, 20}

A perda neuronal na doença de Chagas cardíaca parece ocorrer predominantemente na fase aguda da patologia, com a participação de três mecanismos principais: parasitismo direto nos neurônios, degeneração causada por inflamação periganglionar e reação autoimune antineuronal.^{16, 21, 22}

1.4.2. Distúrbios microvasculares

Esta teoria sugere que anormalidades microvasculares poderiam levar à isquemia do miocárdio, contribuindo com a patogênese da forma cardíaca da doença de Chagas.^{16, 23}

Pesquisas com necrópsias de pacientes crônicos demonstraram colapso difuso de arteríolas com constrição do lúmen, espessamento da membrana basal capilar, vasodilatação e vasoconstrição anormal na microcirculação que causaram danos no miocárdio de pacientes com doença de Chagas.^{16, 24}

Estudos experimentais e clínicos apoiam fortemente o fato de que anormalidades microvasculares funcionais e estruturais ocorrem na cardiopatia chagásica, possivelmente como uma consequência do processo inflamatório. Baseados nesses fatos, é possível que a isquemia microvascular seja um mecanismo patogênico independente, bem como um mecanismo patogênico autossustentado, que pode contribuir de forma importante para potencializar e amplificar a agressão inflamatória crônica ao tecido do miocárdio.¹⁶

1.4.3. Danos ao miocárdio causado pelo parasito

Análises patológicas iniciais sugerem que os danos causados ao tecido do coração e do trato gastrointestinal na fase aguda da doença de Chagas estão relacionados com um intenso parasitismo no órgão alvo.^{16, 23} Entretanto, observações histopatológicas da fase crônica da doença demonstraram uma baixa taxa de parasitismo na fibra do miocárdio e parece não existir uma relação entre o foco da inflamação e a presença de amastigostas do *T. cruzi* neste órgão.^{16, 25, 26} Assim, o papel do parasito no dano cardíaco durante a fase crônica não está claro. Porém, essas evidências foram baseadas em técnicas histopatológicas tradicionais menos sensíveis para a identificação do parasita no hospedeiro infectado.^{16, 27} Pesquisas posteriores, utilizando tecnologias mais avançadas como imunohistoquímica, reação de polimerase em cadeia e métodos de hibridização *in situ* puderam identificar antígenos de *T. cruzi* ou material genômico no local da inflamação.²⁸⁻³³ Estas análises concluíram que os danos no miocárdio poderiam estar diretamente relacionados à presença do parasita. Porém, somente nos estudos em modelos animais, a relação do dano no tecido infectado com a intensidade da inflamação ficou clara, não se replicando em amostras de coração de pacientes.³⁴⁻³⁶

Outras pesquisas em modelos experimentais de doença de Chagas que fizeram tratamento com Benzonidazol observaram redução da parasitemia e, concomitantemente, melhora da cardiomiopatia.^{16, 37, 38}

1.4.4. Lesão no miocárdio mediada pelo sistema imune

O envolvimento do sistema imune na lesão da doença de Chagas foi uma hipótese que surgiu para explicar a escassez de parasitos perante as lesões cardíacas³⁹. Alguns

fatores foram postulados como possíveis mecanismos de autoimunidade após a infecção pela *T. cruzi*, entre eles estão: exposição secundária do antígeno devido ao dano tecidual, seguido de sensibilização em um ambiente inflamado (ativação *bystander*); mimetismo celular (células T e B reconhecem antígenos do parasita que possuem epitopos de estruturas similares aos antígenos do hospedeiro, gerando uma resposta autoimune cruzada).^{16, 40} Além da ativação policlonal que leva à produção de autoanticorpos causando inflamação e danos teciduais.¹⁶

1.4.5. Sistema imune na doença de Chagas

Na fase aguda da doença de Chagas, o alto nível de parasitismo leva a uma forte resposta imune celular e humoral contra o *T. cruzi*, acarretando o controle biológico, mas não a eliminação do parasita. Os componentes do *T. cruzi* (DNA e glicoconjugados) ativam a imunidade inata via receptores do tipo *Toll* em macrófagos e células dendríticas, que após ativação secretam interleucina IL-12 entre outras citocinas pró-inflamatórias e aumentam a expressão de receptores coestimulatórios, causando assim a morte intracelular dos parasitos através da via do óxido nítrico.^{16, 41}

Essas citocinas também ativam outras células inflamatórias e os macrófagos que realizaram a endocitose do parasita; subsequentemente, promovem uma forte resposta de células T e produção de anticorpos. Células T específicas anti *T. cruzi* que produzem IFN- γ são geradas e migram para os sítios nos quais houve indução de inflamação pelo *T. cruzi*, como o miocárdio, em resposta às quimiocinas e o parasitismo sanguíneo.^{16, 17, 42}

A fase crônica é caracterizada pelo controle de parasitemia e da resposta inflamatória observada na aguda. Nela estão presentes as citocinas IFN- γ de resposta Th1

com uma supressão das citocinas IL-4 de Th2, além de um elevado nível do fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica apresentam um aumento no número de células sanguíneas mononucleares periféricas (CD4+, CD8+) e IFN- γ produzidas por células T^{17, 42-44} e uma redução de IL-10 com menor produção de CD4+, CD25+ e células T regulatórias^{17, 45} quando comparados com os pacientes com a forma indeterminada, sugerindo que as células T regulatórias podem exercer um papel no controle da intensidade da inflamação na fase crônica da doença.¹⁷ Além disso, os pacientes chagásicos com cardiomiopatia severa que carregam os alelos do TNF- α associados a uma alta produção de citocinas, têm uma sobrevida menor do que quem possui outros alelos.^{46, 47}

No miocárdio dos pacientes com CCC, também foi observado um aumento da expressão do fator de transcrição Th1 (T-bet), enquanto a expressão de mRNA de GATA3, FoxP3 e ROR γ T e de fatores transcritos da população de Th2, T reg e Th17 encontram-se diminuídos ou não foram detectados. Essas evidências sugerem que os infiltrados com típica resposta Th1 no coração sofrem pouca regulação e não têm nenhuma resistência, o que explica o seu potencial destrutivo, o qual provavelmente está relacionado ao dano colateral causado pelas células T do tipo1 CD8.^{17, 45}

1.5. Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal humano (GI) representa uma das maiores interfaces (250-400 m²) entre o hospedeiro, fatores ambientais e antígenos do corpo humano. Durante a vida, uma média de sessenta toneladas de comida passa pelo trato gastrointestinal humano, juntamente com uma grande quantidade de microrganismos do ambiente, que podem ser benéficos ou prejudiciais à integridade do intestino.⁴⁸

Os grupos Bacteria, Archaea, e Eucarya, que colonizam o trato gastrointestinal, são denominados microbiota intestinal, e têm evoluído com o seu hospedeiro durante milhões de anos para um relacionamento benéfico.^{49, 50}

O número de microrganismos que habita o trato gastrointestinal é estimado em mais de 10^{14} , o que representa dez vezes mais células bacterianas do que humanas e mais de cem vezes o genoma humano.^{49, 51} Entretanto, uma recente revisão sugeriu que o rateio genoma humano: células bacterianas, é atualmente próximo de 1: 1.⁵²

Devido ao vasto número de células bacterianas no corpo, o hospedeiro e os microrganismos que o habitam são frequentemente denominados como superorganismo.^{51,}

53

Cada pessoa possui uma microbiota distinta e altamente variável, mas um grupo conservado de colonizadores do intestino é compartilhado entre os indivíduos e pode ser fundamental para o funcionamento adequado do intestino e do organismo como um todo.⁵⁴ Em indivíduos saudáveis, os filos bacterianos mais abundantes são Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria e a Proteobacteria e a Verucomicrobia, porém com uma menor representatividade. Os gêneros mais comumente encontrados são: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus*.^{55, 56}

As bactérias do intestino podem tanto ser inofensivas como benéficas para o hospedeiro. A microbiota intestinal saudável é estável e realiza várias funções em favor do hospedeiro;⁵⁷ entre elas estão a proteção contra os enteropatógenos, extração de nutrientes e energia da alimentação, além da contribuição para um bom desenvolvimento imunológico.⁵⁸

Bactérias pertencentes aos filos Bacteroidetes e Firmicutes podem fermentar carboidratos indigeríveis (fibras) para produzirem ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos de cadeia ramificada, lactato, etanol, CO₂ e H₂, que são utilizados como fermentadores secundários pelo hospedeiro ou excretados.⁵⁹⁻⁶⁴ Além disso, microrganismos que produzem ácidos graxos de cadeia curta, constituem a principal fonte de energia das células epiteliais do intestino.^{65, 66} As bactérias da microbiota intestinal também podem sintetizar vitaminas benéficas como o folato, a biotina e a vitamina K⁶⁷ e neutralizar potenciais componentes carcinogênicos como pirolisados.⁶⁸

1.6. Desenvolvimento da microbiota intestinal

A composição da microbiota sofre constantes alterações em três fases da vida: no nascimento e durante a amamentação; no desmame para a introdução da alimentação e durante o envelhecimento.⁵⁵

Primeiramente, o trato gastrointestinal era considerado estéril até a colonização por microrganismos residentes no ambiente do nascimento; contudo, recentemente, estudos revelaram a presença de microrganismos no fluido amniótico, na membrana fetal, no cordão umbilical, na placenta e no mecônio.⁶⁹⁻⁷⁴

O trato gastrointestinal após o nascimento é rapidamente colonizado devido a alguns fatores como doenças, tratamento com antibióticos e mudanças na alimentação, causando alterações caóticas na microbiota.^{75, 76}

O tipo de parto também é um fator que parece afetar a composição da microbiota no nascimento. No parto normal, a microbiota do bebê é semelhante à da vagina da mãe, com predomínio das bactérias *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Sneathia*. Entretanto, em cesárea, a microbiota do bebê é semelhante à da pele da mãe, sendo dominada por *Staphylococcus*,

Corynebacterium e *Propionibacterium*.⁷⁷ Importante ressaltar, que a colonização bacteriana dos bebês nascidos por cesárea está associada a um aumento do risco de desenvolvimento de desordens imunológicas como rinites alérgicas, asma e doença celíaca.

78, 79

Logo após o nascimento, ocorre uma grande transição da microbiota para a lactação, resultando em um domínio de *Bifidobacterium*. Outra transição ocorre no período do desmame, com a introdução de alimentos sólidos, juntamente com a amamentação, resultando no estabelecimento de uma microbiota típica de adultos, dominada pelos filos Bacteroidetes e Firmicutes. Essas alterações continuam até os três anos de idade e, posteriormente, é estabelecida uma microbiota intestinal estável, formada principalmente por três gêneros: *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*, os quais são denominados enterotipos.⁸⁰⁻⁸⁶

Em pessoas com mais de sessenta anos, ocorre a diminuição da diversidade da microbiota e o aumento da abundância de *Clostridium* cluster IV e do filo Bacteroidetes, causando uma enorme variação no rateio Firmicutes: Bacteroides, além de uma diminuição de *Bifidobacterium*.^{87, 88}

1.7. Disbiose da microbiota intestinal

A disbiose, uma alteração na composição da microbiota na qual o relacionamento simbiótico entre o hospedeiro e a microbiota intestinal é alterado, pode acarretar várias patologias incluindo doenças autoimunes, alguns tipos de câncer, obesidade, diabetes, má nutrição, doenças inflamatórias intestinais, distúrbios neurológicos, cardíacos, alergias entre outras.⁸⁹⁻⁹¹

Na colite ulcerativa (CU), tipo de doença inflamatória do intestino caracterizada por uma inflamação crônica e feridas (úlceras) ao longo do revestimento do intestino grosso e reto, a disbiose da microbiota intestinal é caracterizada pela baixa proporção de Firmicutes e a alta proporção de Gamaproteobacteria, Deltaproteobacteria (reduzidora de sulfato), Actinobacteria e Proteobacteria quando comparada aos índices observados em indivíduos saudáveis. Em geral, a população de bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* pode levar ao aumento da translocação de Lipopolissacarídeos (LPS) no intestino e, conseqüentemente, a um estado crônico de inflamação, como observado nos pacientes com CU.⁹²⁻⁹⁴

Na Diabetes tipo 2, desordem metabólica crônica, na qual o corpo não produz insulina suficiente ou não pode efetivamente metabolizar a glicose apesar da produção de insulina, a disbiose da microbiota comparada à de indivíduos saudáveis, foi caracterizada por uma alta proporção de Betaproteobacterias. Esta diferença correlaciona-se mais ao aumento dos níveis de glicose no plasma do que ao índice de massa corpórea (IMC), sugerindo que esta espécie de bactéria possa estar envolvida no metabolismo da glicose.^{95,}

96

Em doenças que causam distúrbio neurológico como o autismo, foi observada maior abundância de Proteobacteria e Bacteroidetes e redução de Firmicutes e Bifidobacteria nas crianças doentes quando comparadas às saudáveis. A classe Clostridia que faz parte do filo Firmicutes, está presente em alta frequência nas crianças autistas com histórico de problemas gastrointestinais. Crianças autistas submetidas ao tratamento com Vancomicina (que afeta o crescimento de bactérias gram positivas como a Clostridia),

apresentaram regressão dos sintomas característicos dessa doença os quais retornam após a descontinuidade do tratamento.⁹⁷⁻¹⁰¹

1.8. Tecnologias de sequenciamento de nova geração para análise da microbiota

Por muitos anos, o conhecimento da microbiota intestinal era baseado em métodos de cultura.¹⁰² Atualmente, a identificação da microbiota intestinal teve um grande avanço com a implementação de técnicas independentes de cultura como o sequenciamento de nova geração, que fornece dados de milhares de microrganismos possibilitando uma análise da biodiversidade microbiológica mais abrangente e confiável.¹⁰³

Essa identificação tem como alvo o gene 16S RNA ribossomal (rRNA), o qual é amplamente utilizado em estudos de microbiologia ambiental, de evolução molecular com marcador para classificação taxonômica e de análises filogenéticas de microrganismos¹⁰⁴. Esse gene, que está presente em todas as Bacteria e Archea, contém regiões altamente conservadas para o desenho de amplificadores e regiões hipervariáveis que permitem a identificação de características filogenéticas dos microrganismos, as quais são divididas entre V1 e V9.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹

De modo geral, a região V4 é a mais utilizada em estudos de diversidade microbiana, pois foi considerada a melhor região para estudos filogenéticos, principalmente em nível de filo, além de representar fielmente o perfil taxonômico das comunidades microbianas, quando comparada à caracterização utilizando a sequência completa do gene 16S.¹¹⁰

A primeira plataforma de sequenciamento de nova geração desenvolvida foi a 454 da Roche, sendo capaz de sequenciar cerca de 400 pares de base. Essa plataforma foi

utilizada no Projeto do Microbioma Humano (PMH) do Instituto Nacional de Saúde (INS), que forneceu uma definição aprofundada do microbioma humano sequenciando as regiões V3 a V5 do gene 16S rRNA de 18 sítios do corpo de indivíduos saudáveis, obtendo mais de 10 mil espécimes de 250 adultos saudáveis com uma média de 7 mil sequências por espécime.^{48, 111}

Depois vieram as plataformas da Illumina e do IonTorrent. A plataforma Illumina primeiramente era mais utilizada em estudos comparativos por sequenciar somente uma região hipervariável do gene 16S rRNA, com leituras de 100 pares de bases no sistema Hiseq e 150 pares de bases na tecnologia Miseq.⁴⁸ Atualmente, esta plataforma pode gerar sequências de 300 pares de bases e sequenciar mais de uma região hipervariável do gene 16S para análise simultânea de Bacteria e Archea.¹¹² A tecnologia de *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM) vem se destacando por sua aplicação na identificação de patógenos microbianos e na realização do sequenciamento inteiro do genoma de bactérias, gerando leituras de 400 pares de bases e sendo acessível para laboratórios de pequeno e médio porte.¹¹³⁻¹¹⁵ Foi utilizada em estudos de 16S com diferentes abordagens para caracterização da microbiota em amostra de fezes, de escarro, subgingival, além de muco intestinal.¹¹⁶⁻¹¹⁹

Para a análise dos dados da comunidade microbiana, as ferramentas mais populares são QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) e o mothur. Ambas são ferramentas abertas e acessíveis, porém o QIIME é a mais usada por ser de mais fácil entendimento e por permitir aos usuários importar dados brutos de sequências, analisando mais rapidamente medidas de diversidade inter e intra-amostras comparado ao mothur.^{120,}

1.9. Microbiota e doença de Chagas

Alguns estudos começaram a mostrar que a resposta imunológica a um parasita pode depender da microbiota intestinal.

Villarino et al.¹²² demonstraram que a resistência do camundongo à infecção por malária estava associada à abundância de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no intestino. Esta resistência pode ser transmitida por transplante das fezes de animais resistentes a animais *germfree*, mostrando que a microbiota modula o sistema imune e sua resposta a uma infecção sistêmica por parasita.

Outro exemplo é o estudo de Gilchrist et al.¹²³ realizado em crianças infectadas com *Entamoeba histolytica*. A diarreia ocorria nas crianças que possuíam quantidade maior de bactéria do gênero *Prevotella*. Crianças com *Entamoeba*, mas sem *Prevotella*, eram assintomáticas na maioria das vezes.

Estudos de Duarte et al.^{124, 125} mostraram que a resposta ao *T. cruzi* difere em animais *germfree* em comparação a animais convencionais. Os animais *germfree* não produziam IL10, INF γ e TNF alfa como os animais colonizados com bactérias.

Ainda não existem estudos com a tecnologia de NGS que descrevam a microbiota intestinal em doença de Chagas. É possível que uma pequena alteração do peristaltismo intestinal decorrente da infecção por *T. cruzi* possa alterar a colonização de algumas bactérias. Essas alterações poderão causar mudanças na reatividade do sistema imune; por exemplo, aumentar a resposta autoimune, gerando um maior dano ao coração.

2. Objetivo

- Descrever a microbiota intestinal de pacientes com a doença de Chagas, por meio da amplificação do gene 16S RNA ribossomal.

3. Casuística e métodos

3.1. Período do estudo

De maio de 2014 a dezembro de 2017

3.2. Desenho do estudo

Corte transversal

3.3. Caracterização do local de estudo

O estudo foi conduzido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e o trabalho experimental desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica – LIM 46, setor de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

3.4. População de estudo e seleção da casuística

3.4.1. Seleção dos casos

Foram selecionados pacientes que participaram do projeto “REDS II- História Natural da doença de Chagas”, realizado entre os anos de 2008 a 2010, bem caracterizados clinicamente como forma cardíaca, de acordo com Sabino et al.¹²⁶. Também foram selecionados pacientes do HC-FMUSP e do Instituto de Infectologia Emílio Ribas sem acometimento cardíaco. De cada grupo da doença de Chagas: cardíaco, digestivo, indeterminado e controle foram selecionados em média 30 pacientes. Este número de

pacientes por grupo foi determinado baseado na média de casos estudados em outros estudos que avaliam a microbiota intestinal.

Todas as amostras foram coletadas após a aprovação do projeto pela Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa – CAPPesq (Paracer 1.174.958) (anexo1) e a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos pacientes (anexo2)

3.4.2. Definição dos grupos de sujeitos estudados de acordo com cada forma clínica da Doença de Chagas

- a) Cardíaca: doadores de sangue soropositivo em dois testes de Elisa para *T. cruzi* que participaram do estudo REDS II e foram definidos como cardiopata por um grupo de cardiologistas.
- b) Indeterminada: doadores de sangue soropositivo em dois testes de Elisa para *T. cruzi* que participaram do estudo REDS II com resultados normais nos testes de eletrocardiograma e ecocardiograma.
- c) Digestiva: soropositivo nos testes de Elisa e imunofluorescência para *T. cruzi*.
Estudo radiológico do cólon alterado e resultados de ecocardiograma convencional sem alterações sugestivas de cardiomiopatia da doença de Chagas.
- d) Controle: doadores de sangue soronegativo em dois testes de Elisa para *T. cruzi* que participaram do estudo REDS II.

3.4.3. Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes que fizeram parte de um dos quatro grupos de doença de Chagas definidos no item 3.4.2;

- com idade maior ou igual a 18 anos;
- que leram, compreenderam e assinaram o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido).

3.4.4. Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes:

- que foram tratados com benzonidazol;
- que fizeram uso de antibiótico nos últimos três meses;
- que apresentaram o índice de massa corpórea (IMC) > 40 .
- que tinham a forma mista da doença de Chagas (cardiodigestiva).

3.4.5. Dados epidemiológicos e clínicos

Foram coletados dados clínicos e epidemiológicos de todos os pacientes envolvidos neste estudo como: idade, sexo, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC) e hábito intestinal.

3.5. Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de fezes de todos os pacientes incluídos no estudo, em frascos estéreis contendo 12 mL do tampão de Guanidina 6M/ EDTA 200 nM, os quais foram armazenados a 4°C.

3.6. Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)

A técnica de extração de DNA de amostras de fezes foi realizada segundo Aagaard et al.⁷², utilizando o kit Power Soil® DNA Isolation Kit (MoBio), com modificações de acordo com *Manual of Procedures for Human Microbiome Project*.

Foram pesadas 0,25 gramas das amostras de fezes; em seguida, transferidas para os tubos *Power Bead* que foram agitados durante 30 a 40 segundos. Terminada a agitação, as amostras foram aquecidas a 65°C por 10 minutos; em seguida, a 95°C por 10 minutos e, então, adicionadas a cada tubo, 60 µL da solução C1 a qual foi agitada por 10 minutos com o tubo na posição horizontal. Após serem agitadas, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 30 segundos à temperatura ambiente e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo coletor de 2mL. Aos sobrenadantes, foram adicionados 250 µL da solução C2, agitados por cinco segundos e incubados a 4°C durante cinco minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000g por um minuto à temperatura ambiente. Ao término da centrifugação, 600 µL dos sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo coletor e adicionados 200 µL da solução C3, a qual foi brevemente homogeneizada e incubada novamente a 4°C por cinco minutos.

Terminada a incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000g por dois minutos à temperatura ambiente e 750 µL dos sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo coletor de 2 mL. Aos 750 µL dos sobrenadantes, foi adicionada 1,2 mL da solução C4 e agitada por cinco minutos. Em seguida, da agitação, foram transferidos 675 µL da solução para um tubo com filtro, o qual foi centrifugado a 10.000g por um minuto à temperatura ambiente e os sobrenadantes descartados. Esse procedimento foi repetido até que todo o volume dos sobrenadantes fosse filtrado.

Em cada filtro, foram adicionados 500 μ L da solução C5 e centrifugados a 10.000g por 30 segundos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, as soluções filtradas foram descartadas e os filtros centrifugados novamente por 10.000g durante 1 minuto à temperatura ambiente, para a remoção de possíveis reagentes residuais. Os filtros foram então transferidos para novos tubos coletores de 2 mL aos quais foram adicionados 100 μ L da solução C6 no centro das membranas. Após este procedimento, os tubos foram centrifugados por 30 segundos à temperatura ambiente e ao término da centrifugação, os filtros foram descartados e as amostras de DNA armazenadas a -20°C .

Antes de serem armazenadas a -20°C , foi verificada a pureza das amostras de DNA pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Fischer Scientific*) através da razão 260/280nm e também a concentração de cada amostra de DNA por fluorimetria, fazendo-se uso do equipamento Qubit® Fluorometer 2.0 (Invitrogen Co.) com o kit *Qubit ds DNA BR Assay* de acordo com as informações do fabricante (*Thermo Fischer Scientific*).

3.7. Sequenciamento de Nova Geração

A caracterização da microbiota ocorreu pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 (5'-CACGGTCGKCGGCGCCATT-3') e R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), que gerou um fragmento de 467 pares de bases.¹²⁷ Todos os procedimentos foram feitos segundo o protocolo do fabricante (*Thermo Fischer Scientific*).

3.7.1. Amplificação de sequências-alvo

Para a amplificação das sequências – alvo, foram utilizados 45 µL do *Platinum PCR Super Mix High Fidelity*, de 20–50 ng de DNA genômico e 1 µL da solução estoque de *primer* a 10 µM, obtendo um volume total de 50 µL.

A reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento 58°C por 30 segundos, extensão 68 °C por um minuto e mantidos a 4°C.

3.7.2. Purificação da biblioteca

Para o processo de purificação da biblioteca, foram adicionados 90 µL do reagente *Agencourt® AMPure® XP Reagent* a cada tubo contendo o *amplicom* e incubados cinco minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, os tubos foram posicionados em uma estante magnética e incubados novamente à temperatura ambiente por dois minutos ou até a solução apresentar-se límpida. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e foram adicionados 30 µL de etanol 70% aos tubos e incubados por 30 segundos. Ao término da incubação, os sobrenadantes foram removidos e desprezados, sem que os sedimentos fossem desprendidos. Este processo de lavagem com etanol a 70% foi repetido por mais uma vez.

Após os processos de lavagem, os tubos foram centrifugados rapidamente e reposicionados na estante magnética para a retirada de qualquer volume de sobrenadante remanescente com o auxílio de uma pipeta de 20 µL. Após esse procedimento, os tubos foram incubados durante cinco minutos à temperatura ambiente em uma estante magnética

para a secagem das *beads*. Ao término do período de incubação, os tubos foram removidos da estante magnética e a eles foram adicionados 20 µL de tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) os quais foram homogeneizados com o auxílio de uma pipeta por cinco vezes, seguido de agitação por 10 segundos.

Ao término da agitação, as amostras foram centrifugadas rapidamente e posicionadas novamente em uma estante durante um minuto até que ficassem límpidas. Após o período de incubação, os sobrenadantes contendo o DNA eluído foram transferidos para novo tubo *Eppendorf LoBind* de 1,5 mL, sem que os sedimentos fossem dissolvidos.

3.7.3. Preparo do pool equimolar das bibliotecas amplificadas

O agrupamento das amostras em quantidades equimolares permite a total cobertura das regiões-alvo. Para tanto, cada amostra foi quantificada por fluorometria no equipamento Qubit® Fluorometer 2.0 (InvitrogenCo.) utilizando o kit *Qubit ds DNA BR Assay* de acordo com as informações do fabricante (*Thermo Fischer Scientific*) e diluídas para 310 milhões de moléculas. Após a diluição, as amostras foram adicionadas em um novo tubo *Eppendorf LoBind* de 1,5 mL em uma mesma proporção para um volume total de 25 µL.

Para a diluição das amostras de DNA a 310 milhões de moléculas, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Moléculas}/\mu\text{L} = \frac{\text{concentração da amostra (ng}/\mu\text{L}) \times 6.022 \times 10^{23}}{656.6 \times 10^9 \times \text{tamanho médio dos fragmentos (bp)}}$$

3.7.4. PCR em emulsão

A PCR em emulsão permite que cada sequência de nucleotídeos seja amplificada individualmente em microesferas suspensas em uma emulsão oleosa.

3.7.4.1. Preparo da solução de amplificação

Em um tubo *Eppendorf LoBind*® de 1,5 mL foram adicionados os seguintes componentes, na ordem: 1º 500 µL do *Ion PGM™ Template OT2 400 Reagent Mix*, 2º 285 µL do *Ion PGM™ Template OT2 400 PCR Reagent B*, 3º 50 µL do *Ion PGM™ Template OT2 400 Enzyme Mix*, 4º 40 µL *Ion PGM™ Template OT2 400 Reagent Mix* e 5º 25 µL da biblioteca diluída, em um volume total de 900 µL.

À solução de amplificação de 900 µL, foram adicionados 100 µL do reagente *PGM™ Template OT2 400 Ion Sphere™ Particles* para um volume total de 1000 µL e agitada por cinco minutos. Após a agitação, todo o volume foi transferido para o filtro *Ion PGM™ One Touch Plus Reaction Filter Assembly* o qual foi colocado no equipamento *One Touch 2* para que ocorresse a reação de PCR em emulsão.

Ao término da reação de PCR em emulsão, removeu-se o sobrenadante dos tubos deixando somente 50 µL, os quais foram unidos em um tubo *Eppendorf LoBind*® de 1,5 mL e procedeu-se ao processo de enriquecimento.

3.7.4.2. Enriquecimento

Após a amplificação por PCR em emulsão, as amostras que não tiveram as sequências amplificadas ao redor das microesferas foram eliminadas por meio de um procedimento de enriquecimento.

3.7.4.3. Solução Melt-Off

Para o procedimento de enriquecimento, primeiramente foram preparadas as soluções *Melt-Off* e *Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads*. Na solução de *Melt-Off*, foram combinados os seguintes reagentes: 280 µL da Solução *Tween®*, 40 µL de 1M NaOH, em uma solução total de 320 µL. Para o preparo da solução *Dynabeads® My One™ Streptavidin C1 Beads* foram transferidos 13 µL desta solução para um novo tubo Eppendorf LoBind® de 1,5 mL, o qual foi posicionado em uma estante magnética durante dois minutos. Ao término dos dois minutos de incubação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 130 µL do reagente *MyOne™ Beads Wash Solution*, a solução foi então agitada por 30 segundos e centrifugada rapidamente.

Ao término do preparo desses dois reagentes, foi realizado o preenchimento da tira de reação de enriquecimento.

3.7.4.4. Preenchimento da tira da reação de enriquecimento

O preenchimento da tira da reação de enriquecimento foi realizado na seguinte ordem: poço 1: 100 µL solução da amostra, poço 2: 130 µL de *Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1* (preparada no item 5.4.5.1), poço 3: 300 µL *Ion One Touch™ Wash Solution*, nos poços 3, 4, 5 e 7: 300 µL da solução *Melt-Off*, e os poços 6 e 8 ficaram vazios. Após o preenchimento dos poços, a tira foi posicionada no aparelho *Enrichment System* (Thermo Fisher Science), juntamente com um tubo de 0,2 mL contendo 10 µL de solução *Neutralization Solution*.

Imediatamente após a reação de enriquecimento, o tubo de 0,2 mL contendo as amostras enriquecidas foi homogeneizado durante cinco vezes por inversão e as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento.

3.7.5. Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, foram adicionadas às amostras enriquecidas 5 μ L do reagente *Control Ion Sphere™ Particles*, homogeneizados e centrifugados por dois minutos a $15,500 \times g$. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido até que restasse somente 15 μ L aos quais foram adicionados 12 μ L do *primer* de sequenciamento seguidos de agitação. Ao término da agitação, a reação foi colocada em um termociclador para o anelamento dos *primers* de sequenciamento com os seguintes parâmetros: dois minutos a 97°C e dois minutos a 37°C.

Após o anelamento dos *primers* de sequenciamento, foram adicionados 3 μ L de *Ion PGM™ Sequencing 400 v2 Polymerase*, homogeneizados com o auxílio de uma pipeta e incubados por cinco minutos à temperatura ambiente. Ao término do período de incubação, todo o volume da amostra (~ 30 μ L) foi introduzido em um chip ion 318 v2 (*Thermo Fisher Scientific*) e colocado no sequenciador *Ion Torrent PGM* (*Thermo Fisher Scientific*), para a realização do sequenciamento.

3.8. Análise dos resultados

3.8.1. Análise dos dados clínicos e epidemiológicos

Os dados estão representados em média $\pm$ desvio padrão. Para comparar variáveis categóricas entre os grupos, foi utilizado o teste de Qui-quadrado, e para comparar

variáveis contínuas, o teste de Kruskal-Wallis no programa GraphPad Prism (versão 6). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.8.2. Análise do sequenciamento

Após o sequenciamento, as sequências geradas pelo *Ion PGM Torrent* foram filtradas utilizando o *software Torrent Browser*, para a remoção das policlonais e de baixa qualidade.

Os arquivos *fastq* gerados pelo *Torrent Browser* foram analisados utilizando o *software* QIIME versão 1.8 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*)¹²⁸ de acordo com o protocolo de análise do *Brazilian Microbiome Project*¹²⁹. As leituras inferiores a 50pb foram descartadas e as sequências remanescentes foram agrupadas em Unidades Operacionais Taxonômicas (OTUs), baseando-se em similaridade de 97%, utilizando o algoritmo UPARSE (versão 7).¹³⁰ OTUs foram classificadas taxonomicamente de acordo com o *Ribosomal Database Project*¹³¹, com o *software* QIIME, utilizando como referência o banco de dados *Greengenes* (versão 13.8).¹³² Esse processo resultou na formação de árvores filogenéticas com formato padrão Newick, as quais foram utilizadas posteriormente para o cálculo de Unifrac.

Também foram analisadas, no *software* QIIME, as diversidades alfa e beta. Para a análise da alfa diversidade, diversidade taxonômica dentro de uma mesma população, foram analisados utilizando os índices de Shannon, Simpson, Chao 1 e o número de espécies observado.

O índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá a um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a

diversidade da amostra é baixa. A diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice. Este índice é calculado por meio da fórmula $H' = -\sum_1^S (p_i \cdot \ln p_i)$ onde p_i : frequência de cada espécie, para i variando de 1 a S (Riqueza).^{129, 133}

O índice de Simpson é de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Varia de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior é a diversidade de espécies da amostra. É calculado como: $1/\lambda = \sum_1^S p_i^2$ onde p_i : proporção de cada espécie, para i variando de 1 a S (Riqueza), e p_i : frequência da espécie i .^{129, 133}

Chao 1 estima o número total de espécies presente em uma comunidade. A fórmula para calcular Chao 1 é $Chao\ 1 = S_{obs} + (a^2 / 2b)$, na qual S_{obs} é o número de espécies observado nas amostras, “a” é o número de espécies representadas por apenas um espécime, e “b” é o número de espécies representado por exatamente dois espécimes.¹³⁴

E o número de espécies observado único é a quantidade de unidades taxonômicas operacionais de (OTUs) presentes em cada amostra.¹³⁵

E para a análise da beta diversidade, diversidade taxonômica entre populações, foi realizada análise de coordenadas principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac.

UniFrac é um cálculo de distância que compara a história evolutiva de diferentes comunidades microbianas, através da medida da distância dos ramos de uma árvore filogenética compartilhada entre duas ou mais comunidades. A distância pode ser qualitativa - não ponderada- quando leva em consideração somente as diversidades de espécies presentes ou quantitativa - ponderada - levando em consideração tanto a diversidade das espécies presentes como a abundância de cada uma.¹³⁶

Para determinar as diferenças estatisticamente significantes que ocorreram nas populações microbianas entre as formas da doença de Chagas estudadas, primeiramente foi realizada uma rarefação para o mesmo número de sequências entre todas as amostras, sendo 19.765 quando comparadas as formas, indeterminada, cardíaca, megacólon e o grupo controle. Após a rarefação, a abundância relativa foi calculada utilizando os testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U-test no programa estatístico GraphPad Prism (versão 6). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Para a análise de estatística da alfa diversidade foi realizado o teste de Mann-Whitney U-test no programa GraphPad Prism (versão 6). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística da beta diversidade foi realizada utilizando o teste ANOSIM, método não paramétrico baseado em matriz de distância, no software QIIME, sendo considerados valores de $p < 0,05$ estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1. População do estudo

Foram avaliadas amostras de fezes obtidas de 104 indivíduos, tanto portadores de doença de Chagas como controles saudáveis, com idade entre 44 e 71 anos, sendo que 30 possuem a forma cardíaca da doença, 32 a indeterminada e 11 a digestiva (megacólon), além de 31 pacientes controles. As coletas ocorreram no período de outubro de 2014 a dezembro de 2015 (Tabela1).

Tabela 1 - Características epidemiológicas e clínicas dos 104 pacientes portadores da doença de Chagas e controles.

Dados demográficos	Cardíaca (n=30)	Indeterminada (n=32)	Digestiva (n=11)	Controle (n=31)	Valor de p
Idade (anos) média±DP	59 ± 7	58 ± 9	55 ± 11	62 ± 9	0,099
Sexo masculino n (%)	20 (66%)	22 (73%)	0%	17 (57%)	<0,001
Altura (m) média±DP	1,64 ± 0,31	1,64 ± 0,08	1,60 ± 0,07	1,66 ± 0,08	0,168
Peso (Kg) média±DP	71,1 ± 19,07	72,7 ± 10	66,5 ± 11,5	79,2 ± 22,5	0,321
IMC média±DP	27 ± 4	27 ± 3	26 ± 4	29 ± 8	0,549
Hábito intestinal					
1 ou mais vezes por dia n (%)	24 (80%)	29 (91%)	4 (36%)	31 (100%)	
1 vez a cada 2-3 dias n (%)	5 (17%)	2 (6%)	4 (36%)	0	<0,001**
1 vez por semana n (%)	0	0	2 (18%)	0	
menos de uma vez por semana n (%)	1 (3%)	1 (3%)	1 (9%)	0	

Os valores estão representados em média ± desvio padrão;* valor de p – calculado utilizando o método *Kruskal Wallis test*; ** valor de p calculado por Qui-quadrado.

Todos os pacientes controles e portadores da forma cardíaca ou indeterminada já haviam sido bem caracterizados anteriormente no projeto “REDS II- História Natural da doença de Chagas” (entre 2008-2010), mas para a caracterização da forma digestiva, foram avaliados os dados dos prontuários de todos os pacientes com o auxílio de um médico infectologista.

A microbiota intestinal foi analisada com o objetivo de determinar a abundância relativa de bactérias nos diferentes níveis taxonômicos. Para tal, foram comparados os dados obtidos em amostras de fezes de cada forma clínica com o grupo controle, após a amplificação da região hipervariável V4 de 16S rRNA seguida pelo sequenciamento do DNA. Este procedimento resultou em 7.220.106 leituras, com média de 69.424 sequências por amostra.

Para todas as amostras, foi realizado o processo de rarefação tendo como base a amostra que apresentou o menor número de sequências (n= 19.765). As sequências foram agrupadas em OTUs, baseando-se em similaridade de 97%, com o auxílio do programa QIIME,¹²⁸ utilizando como fonte o banco de dados *Greengenes* (versão 13.8).¹³² Apenas os grupos com frequência média acima de 0.1% foram analisados.

4.2. Análise do grupo controle vs forma indeterminada

A curva de rarefação para amostras de fezes de pacientes controles e portadores da forma indeterminada da doença de Chagas está ilustrada na Figura 3 e mostra que o número de leituras realizado foi suficiente para determinar a diversidade microbiana das amostras.

Figura 3 - Curvas de rarefação demonstrando o número estimado de OTUs na forma indeterminada e controle, em função do esforço de sequenciamento gerado através da plataforma QIIME.

A alfa diversidade analisada através da estimativa de riqueza Chao1, índice de Shannon, índice de diversidade de Simpson e número de espécies observadas, não demonstrou diferenças significativas intra amostras no grupo controle e portadores da forma indeterminada, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Estimativa da diversidade alfa entre o grupo controle e a forma indeterminada da doença de Chagas.

	Controle	Indeterminada	valor de p*
Estimativa de riqueza Chao1	538	509	0,421
Índice de Shannon	5,27	5,37	0,473
Índice de diversidade de Simpson	0,92	0,92	0,736
Número de espécies observadas	445	428	0,789

* valor de p – calculado utilizando o método *Mann-Whitney U-test*.

Na figura 4, está ilustrada a análise da beta diversidade (diversidade taxonômica entre populações) realizada através do método de Análise de Coordenadas Principais

(PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac ponderada (Figura 4a) e não ponderada (Figura 4b). Podemos observar que não houve variação da comunidade bacteriana nas amostras de fezes de pacientes controles comparada com a forma indeterminada da doença de Chagas na PCoA ponderada; porém houve uma pequena tendência na PCoA não ponderada em separar os dois grupos. Para confirmar estes resultados, foi realizada, através do software QIIME, a análise estatística ANOSIM, método não paramétrico baseado em matriz de distância, obtendo um valor de p 0,12 para a análise da PCoA ponderada e de p 0,029 para a análise da PCoA não ponderada, apresentando esta uma diferença significativa entre os dois grupos.

Figura 4 - Análise da comunidade bacteriana nas amostras de fezes pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ponderada (a) e não ponderada (b) nos grupos controles e forma indeterminada.

4.2.1. Análise da taxa de abundância relativa

Os dados de abundância relativa em nível de filo nos pacientes controles e nos portadores da forma clínica indeterminada de doença de Chagas estão apresentados na Tabela 3 e Figura 5. Os filos mais abundantes foram Firmicutes e Bacteroidetes, com um rateio de 2,08 para o grupo controle e 2,94 para a forma indeterminada, sugerindo, assim, tendência à redução de Bacteroidetes nas amostras de fezes desta forma clínica e alteração da microbiota em direção a Firmicutes.

Tabela 3 - Abundância relativa de Bacteria em nível de filo de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada. *Diferença estatisticamente significativa * $p < 0,05$ (Mann Withney).

Filo	Controle	Indeterminado	Valor de p^*
Actinobactéria	0,56% $\pm$ 0,57%	1,05% $\pm$ 1,11%	0,073
Bacteroidetes	40,22% $\pm$ 18,41%	32,53% $\pm$ 16,52%	0,064
Cyanobactéria	0,06% $\pm$ 0,09%	0,17% $\pm$ 0,30%	0,658
Elusimicrobia	0,03% $\pm$ 0,07%	0,09% $\pm$ 0,47%	0,080
Firmicutes	52,35% $\pm$ 17,37%	55,97% $\pm$ 17,12%	0,251
Fusobactéria	0,49% $\pm$ 2,28%	1,54% $\pm$ 8,19%	1,000
Lentisphaerae	0,41% $\pm$ 0,79%	0,50% $\pm$ 0,98%	0,638
Proteobacteria	4,80% $\pm$ 3,86%	6,22% $\pm$ 8,80%	0,319
Tenericutes	0,95% $\pm$ 1,32%	1,82% $\pm$ 3,46%	0,951
Verrucomicrobia	0,08% $\pm$ 0,10%	0,06% $\pm$ 0,09%	0,524

Figura 5 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de filo em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e indeterminado.

Os dados sobre a abundância relativa de bactéria em nível de classe estão apresentados na Tabela 4 e na Figura 6. Apesar de não terem sido demonstradas diferenças na abundância do filo Proteobacteria entre os grupos (diferença não significativa, Tabela 3), encontramos redução da classe Betaproteobacteriana, forma indeterminada em relação ao controle, a qual foi não foi estatisticamente significativa após a correção de Bonferroni.

Tabela 4 - Abundância relativa de Bacteria em nível de classe de amostras de fezes de pacientes do grupo de controle e da forma indeterminada. *Diferença estatisticamente significante *p<0,05 (Mann Withney).

Classe	Controle	Indeterminado	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
Actinobacteria	0,51% ± 0,56%	1,00% ± 1,10%	0,075	0,084
Coriobacteriia	0,05% ± 0,04%	0,05% ± 0,03%	0,658	
Bacteroidia	40,97% ± 18,57%	31,89% ± 16,45%	0,064	
Elusimicrobia	0,03% ± 0,07%	0,08% ± 0,46%	0,080	
Bacilli	1,51% ± 2,87%	1,76% ± 2,62%	0,226	
Clostridia	48,09% ± 17,56%	52,34% ± 16,58%	0,219	
Erysipelotrichi	1,82% ± 2,07%	2,65% ± 2,79%	0,143	
Fusobacteriia	0,48% ± 2,24%	1,49% ± 8,06%	1	
Alphaproteobacteria	0,64% ± 1,72%	0, 16% ± 0,42%	0,239	
Betaproteobacteria	2,04% ± 2,37%	1,31% ± 2,39%	0,006	
Deltaproteobacteria	0,52% ± 0,54%	0,45% ± 0,66%	0,309	
Gammaproteobacteria	1,87% ± 3,45%	4,19% ± 8,64%	0,458	
Mollicutes	0,86% ± 1,27%	1,65% ± 3,31%	0,912	
Verrucomicrobiae	0,07% ± 0,10%	0,04% ± 0,07%	0,694

Figura 6 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de classe em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada.

Os dados do microbioma em nível de família estão apresentados na Tabela 5 e Figura 7. Na forma indeterminada, foi observada redução da abundância de Bacteroidetes (Tabela 3), o que está de acordo com a redução da abundância da classe Bacteroidia (Tabela 4) e das famílias *Bacteroidaceae* e *Rikenellaceae*. (Tabela 5), embora estas diferenças não tenham sido estatisticamente significantes após correção de Bonferroni.

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram também que a maior abundância da classe Betaproteobacteria nas amostras controle foi principalmente devido à maior abundância da família *Alcaligenaceae/Sutterellaceae*, (Tabela 5).

Tabela 5 - Abundância relativa de Bacteria em nível de família de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada. *Diferença estatisticamente significante *p<0,05 (Mann Withney).

Família	Controle	Indeterminado	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,50% ± 0,56%	0,99% ± 1,10%	0,079	
<i>Coriobacteriaceae</i>	0,05% ± 0,04%	0,05% ± 0,03%	0,658	
<i>Bacteroidaceae</i>	26,11% ± 19,95%	15,46% ± 14,37%	0,030	0,760
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,59% ± 0,67%	0,55% ± 0,51%	0,837	
<i>Prevotellaceae</i>	11,27% ± 16,55%	13,25% ± 15,58%	0,293	
<i>Rikenellaceae</i>	0,23% ± 0,21%	0,17% ± 0,24%	0,012	0,310
<i>Elusimicrobiaceae</i>	0,03% ± 0,07%	0,08% ± 0,46%	0,080	
<i>Lactobacillaceae</i>	0,38% ± 1,03%	0,47% ± 0,61%	0,452	
<i>Leuconostocaceae</i>	0,21% ± 0,61%	0,24% ± 0,77%	0,287	
<i>Streptococcaceae</i>	0,84% ± 1,74%	0,91% ± 1,53%	0,542	
<i>Christensenellaceae</i>	0,13% ± 0,25%	0,21% ± 0,27%	0,059	
<i>Clostridiaceae</i>	0,73% ± 0,83%	1,23% ± 2,23%	0,237	
<i>Lachnospiraceae</i>	17,29% ± 6,80%	19,00% ± 9,54%	0,287	
<i>Peptococcaceae</i>	0,04% ± 0,05%	0,07% ± 0,09%	0,173	
<i>Ruminococcaceae</i>	22,78% ± 11,05%	22,86% ± 9,89%	0,989	
<i>Veillonellaceae</i>	0,82% ± 1,12%	0,81% ± 1,15%	0,934	
<i>Erysipelotrichaceae</i>	1,82% ± 2,07%	2,65% ± 2,79%	0,143	
<i>Fusobacteriaceae</i>	0,48% ± 2,24%	1,49% ± 8,06%	0,874	
<i>Victivallaceae</i>	0,39% ± 0,78%	0,52% ± 0,97%	0,649	
<i>Alcaligenaceae/ Suterellaceae</i>	2,03% ± 2,38%	1,30% ± 2,39%	0,006	0,143
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,54% ± 0,54%	0,45% ± 0,66%	0,309	
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,81% ± 2,47%	3,60% ± 8,74%	0,861	
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,00% ± 2,32%	0,44% ± 0,53%	0,741	
<i>Pasteurellaceae</i>	0,06% ± 0,11%	0,15% ± 0,41%	0,870	
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0,07% ± 0,10%	0,04% ± 0,07%	0,693

Figura 7 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bactéria em nível de família em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada.

Na análise dos níveis de gêneros apresentados na Tabela 6 e Figura 8, foi observada uma redução na abundância de *Bacteroides* e de *Bilophila*, na forma indeterminada, quando comparada ao grupo controle. A redução de *Bacteroides* está de acordo com a Tabela 5 que apresentou redução da família *Bacteroidaceae*; porém, vale ressaltar que esta diferença foi perdida após a correção de Bonferroni. Já a família *Desulfovibrionaceae*, apesar de não ter um valor de p significativo, também apresentou

decréscimo na forma indeterminada, corroborando para o menor nível de abundância do gênero *Bilophila*.

Na análise de gêneros, também foi observada maior abundância do gênero *Suterella* nas amostras controle (Tabela 6), corroborando com a maior abundância da classe Betaproteobacteria (Tabela 4), e da família *Alcaligenaceae/Sutterellaceae* (Tabela 5), ambas com maior proporção no grupo controle.

Tabela 6 - Abundância relativa de Bacteria em nível de gênero de amostras de fezes de pacientes do grupo de controle e da forma indeterminada. *Diferença estatisticamente significativa *p<0,05 (Mann Withney).

Gênero	Controle	Indeterminado	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Bifidobacterium</i>	0,50% ± 0,56%	0,98% ± 1,10%	0,079	0,870
<i>Bacteroides</i>	26,11% ± 19,95%	15,46% ± 14,37%	0,03	
<i>Parabacteroides</i>	0,59% ± 0,67%	0,55% ± 0,51%	0,858	
<i>Prevotella</i>	11,27% ± 16,55%	13,25% ± 15,58%	0,292	
<i>Butyricimonas</i>	0,37% ± 0,39%	0,30% ± 0,35%	0,470	
<i>Odoribacter</i>	0,49% ± 0,53%	0,47% ± 0,58%	0,654	
<i>Paraprevotella</i>	0,25% ± 0,48%	0,21% ± 0,26%	0,295	
<i>Lactobacillus</i>	0,38% ± 1,03%	0,45% ± 0,61%	0,699	
<i>Streptococcus</i>	0,81% ± 1,70%	0,86% ± 1,52%	0,675	
<i>Clostridium</i>	0,09% ± 0,22%	0,09% ± 0,26%	0,631	
<i>Anaerostipes</i>	0,16% ± 0,45%	0,04% ± 0,07%	0,088	
<i>Blautia</i>	2,26% ± 1,67%	1,76% ± 1,01%	0,284	
<i>Coprococcus</i>	1,66,% ± 1,41%	1,44% ± 0,95%	0,863	
<i>Dorea</i>	0,93% ± 0,83%	0,80% ± 0,60%	0,483	
<i>Lachnospira</i>	0,93% ± 0,53%	1,01% ± 0,66%	0,726	
<i>Roseburia</i>	1,19% ± 0,94%	1,02% ± 0,83%	0,462	
<i>Faecalibacterium</i>	13,25% ± 8,14%	13,11% ± 8,35%	0,831	
<i>Oscillospira</i>	0,41% ± 0,21%	0,39% ± 0,23%	0,582	
<i>Ruminococcus</i>	2,31% ± 2,77%	1,90% ± 1,40%	0,564	
<i>Dialister</i>	0,65% ± 1,08%	0,56% ± 1,09%	0,399	
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,08% ± 0,09%	0,07% ± 0,07%	0,708	
<i>Catenibacterium</i>	0,16% ± 0,22%	0,23% ± 0,32%	0,596	
<i>Fusobacterium</i>	0,48% ± 2,24%	1,49% ± 8,06%	0,874	

Gênero	Controle	Indeterminado	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Sutterella</i>	2,02% ± 2,38%	1,30% ± 2,39%	0,006	0,174
<i>Bilophila</i>	0,15% ± 0,12%	0,08% ± 0,17%	0,002	0,058
<i>Desulfovibrio</i>	0,36% ± 0,53%	0,36% ± 0,65%	0,901	
<i>Succinivibrio</i>	0,81% ± 2,47%	3,59% ± 8,75%	0,965	
<i>Haemophilus</i>	0,06% ± 0,10%	0,13% ± 0,37%	0,873	
<i>Akkermansia</i>	0,07% ± 0,10%	0,04% ± 0,07%	0,693

Figura 8 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bactéria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma indeterminada.

Não foram observadas diferenças na riqueza e alfa diversidade da microbiota de fezes entre pacientes controles e com a forma indeterminada da doença de Chagas. No

entanto, a análise da beta diversidade mostrou diferenças significantes entre os dois grupos quando a análise foi realizada avaliando-se sua abundância (PCoA não ponderada) e não número de OTUs (PCoA ponderada).

A comparação da microbiota das fezes desses dois grupos permitiu determinar que os pacientes com a doença na forma indeterminada apresentam alteração da microbiota intestinal, com redução da abundância da família *Bacteroidaceae*, representada, principalmente, pelo gênero *Bacteroides*, e da família *Alcaligenelaceae/Suterellaceae*, representada, principalmente, pelo gênero *Suterella*. Outras alterações puderam ser observadas, embora em menores proporções, como redução da abundância relativa da família *Rikenellaceae* e do gênero *Bilophila*.

4.3. Análise do grupo controle vs forma cardíaca

Através da curva de rarefação para amostras de fezes de pacientes controles e com a forma cardíaca da doença de Chagas, ilustrada na Figura 9, foi observado que o número de leituras realizado foi suficiente para determinar a diversidade microbiana das amostras.

Figura 9 - Curvas de rarefação demonstrando o número estimado de OTUs no grupo controle e na forma cardíaca, em função do esforço de sequenciamento gerado através da plataforma QIIME.

A Alfa diversidade analisada através da estimativa de riqueza Chao1, índice de Shannon, índice de diversidade de Simpson e número de espécies observadas, não demonstrou diferenças significativas intra amostras no grupo controle e portadores da forma cardíaca, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Estimativa da diversidade alfa entre o grupo controle e a forma cardíaca da doença de Chagas.

	Controle	Cardíaca	valor de p*
Estimativa de riqueza Chao1	531	490	0,466
Índice de Shannon	5.35	5	0,423
Índice de diversidade de Simpson	0.92	0.88	0,530
Número de espécies observadas	441	391	0,444

* valor de p – calculado utilizando o método *Mann-Whitney U - test*.

A análise da beta diversidade - diversidade taxonômica entre populações -, foi realizada através do método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac ponderada (Figura 10a) e não ponderada (Figura 10b). Foi possível observar que não houve uma variação da comunidade bacteriana nas amostras de fezes de pacientes controles comparados com a forma cardíaca da doença de Chagas. Para confirmar estes resultados, foi realizada, através do software QIIME, a análise estatística ANOSIM - método não paramétrico - que é baseada em matriz de distância, obtendo um valor de p 0,11 para a análise da PCoA ponderada e de p 0,11 para a análise da PCoA não ponderada, não apresentando diferença significativa entre os dois grupos em ambas as análises.

Figura 10 - Análise da comunidade bacteriana nas amostras de fezes pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ponderada (a) e não ponderada (b) no grupo controle e na forma indeterminada.

4.3.1. Análise da taxa de abundância relativa

Os dados de abundância relativa em nível de filo nos pacientes controles e com a forma clínica cardíaca da doença de Chagas estão apresentados na Tabela 8 e Figura 11. Os filos mais abundantes foram Firmicutes e Bacteroidetes, com um rateio de 2,08 para o grupo controle e 3,40 para a forma cardíaca, sugerindo uma pequena tendência à redução de Bacteroidetes nas amostras de fezes na forma cardíaca e uma alteração da microbiota em direção a Firmicutes, como também observado na forma indeterminada (Tabela 3).

A única diferença significativa entre os grupos foi o filo Verrucomicrobia cuja abundância relativa foi menor na forma cardíaca. Apesar da sua frequência ser menor que 1% em ambos os grupos, esta diferença permaneceu significativa após correção por

Bonferroni. Por este motivo, este grupo de bactéria entrou em todas as análises subsequentes mesmo se estivesse em uma proporção menor que 0,1%

Tabela 8 - Abundância relativa de Bactéria em nível de filo de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca. *Diferença estatisticamente significativa * $p < 0,05$ (Mann Withney).

Filo	Controle	Cardíaco	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
Actinobacteria	0,56% $\pm$ 0,57%	0,65% $\pm$ 0,87%	0,778	
Bacteroidetes	40,97% $\pm$ 18,57%	39,07% $\pm$ 22,91%	0,639	
Cyanobacteria	0,06% $\pm$ 0,09%	0,18% $\pm$ 0,35%	0,348	
Firmicutes	51,42% $\pm$ 17,84%	53,05% $\pm$ 24,47%	0,618	
Fusobacteria	0,48% $\pm$ 2,24%	0,60% $\pm$ 2,01%	0,353	
Lentisphaerae	0,44% $\pm$ 0,84%	0,26% $\pm$ 0,57%	0,494	
Proteobacteria	5,07% $\pm$ 4,08%	4,71% $\pm$ 6,89%	0,116	
Tenericutes	0,91% $\pm$ 1,31%	1,43% $\pm$ 3,08%	0,724	
Verrucomicrobia	0,08% $\pm$ 0,10%	0,02% $\pm$ 0,04%	0,0032	0,0288

Figura 11 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bactéria em nível de filo em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca.

Os dados sobre a abundância relativa em nível de classe estão apresentados na Tabela 9. Apesar de não terem sido demonstradas diferenças na abundância do filo Proteobacteria entre os grupos (Tabela 8), observou-se uma alteração da microbiota nos pacientes com a forma cardíaca da doença, com redução das classes Betaproteobacteria e Alphaproteobacteria em relação ao controle, mas esta proporção não se manteve após correção de Bonferroni. A classe Verrucomicrobiae permaneceu menor na forma cardíaca, mesmo após correção por Bonferroni.

Tabela 9 - Abundância relativa de Bacteria em nível de classe de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca. *Diferença estatisticamente significante *p<0,05 (Mann Withney).

Classe	Controle	Cardíaco	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
Actinobacteria	0,51% ± 0,56%	0,61% ± 0,86%	0,897	
Bacteroidia	40,97% ± 18,57%	39,07% ± 22,91%	0,639	
Bacilli	1,51% ± 2,87%	1,29% ± 1,85%	0,634	
Clostridia	48,09% ± 17,56%	50,01% ± 24,11%	0,475	
Erysipelotrichi	1,82% ± 2,07%	1,75% ± 1,48%	0,578	
Fusobacteriia	0,48% ± 2,24%	0,60% ± 2,01%	0,353	
Alphaproteobacteria	0,64% ± 1,71%	0,02% ± 0,05%	0,027	0,318
Betaproteobacteria	2,04% ± 2,37%	1,29% ± 1,69%	0,044	0,528
Deltaproteobacteria	0,52% ± 0,54%	0,32% ± 0,27%	0,330	
Gammaproteobacteria	1,87% ± 3,45%	3,07% ± 6,73%	0,355	
Mollicutes	0,86% ± 1,27%	1,00% ± 1,80%	0,795	
Verrucomicrobiae	0,07% ± 0,10%	0,01% ± 0,02%	0,0004	0,005

Figura 12 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de classe em amostras fecais obtidas de pacientes controle e da forma cardíaca.

A maior abundância de Betaproteobacteria nas amostras controle (Tabela 9) foi principalmente devido à maior abundância da família *Alcaligenaceae/Sutterellaceae*, nestas amostras em relação às de pacientes com a forma cardíaca (Tabela 10), como também constatada na forma indeterminada da doença.

Nas amostras de pacientes com a forma cardíaca, também foi observada redução da abundância relativa das famílias *Bacteroidaceae* e *Rikenellaceae* em relação ao grupo controle e um aumento não significativo de *Prevotellaceae*. Já entre o filo Firmicutes, apenas a família *Veillonellaceae* apresentou maior abundância nas amostras das fezes dos pacientes com a forma cardíaca em relação às amostras do grupo controle.

A família *Verrucomicrobiaceae* permaneceu menor na forma cardíaca mesmo após correção por Bonferroni, confirmando os dados encontrados no filo Verrucomicrobia (Tabela 8) e na classe Verrucomicrobiae (Tabela 9).

Tabela 10 - Abundância relativa de Bacteria em nível de família de amostras de fezes de pacientes do grupo de controle e da forma cardíaca. *Diferença estatisticamente significativa *p<0,05 (Mann Withney).

Família	Controle	Cardíaco	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,50% ± 0,56%	0,60% ± 0,86%	0,851	1
<i>Bacteroidaceae</i>	25,92% ± 19,80%	16,33% ± 14,59%	0,061	
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,59% ± 0,67%	0,50% ± 0,48%	0,507	
<i>Prevotellaceae</i>	11,22% ± 16,53%	19,56% ± 23,91%	0,252	0,156
<i>Rikenellaceae</i>	0,46% ± 0,56%	0,24% ± 0,37%	0,007	
<i>Lactobacillaceae</i>	0,38% ± 1,03%	0,13% ± 0,18%	0,547	
<i>Leuconostocaceae</i>	0,21% ± 0,61%	0,23% ± 0,80%	0,554	
<i>Streptococcaceae</i>	0,84% ± 1,74%	0,79% ± 1,31%	0,254	
<i>Turicibacteraceae</i>	0,06% ± 0,12%	0,11% ± 0,36%	0,141	
<i>Christensenellaceae</i>	0,13% ± 0,26%	0,14% ± 0,19%	0,617	1
<i>Clostridiaceae</i>	0,63% ± 0,83%	0,68% ± 0,77%	0,914	
<i>Lachnospiraceae</i>	17,13% ± 6,65%	15,42% ± 9,99%	0,252	
<i>Peptococcaceae</i>	0,04% ± 0,05%	0,07% ± 0,10%	0,741	
<i>Ruminococcaceae</i>	22,83% ± 11,09%	27,02% ± 21,14%	0,767	
<i>Veillonellaceae</i>	0,83% ± 1,12%	1,44% ± 1,81%	0,069	
<i>Erysipelotrichaceae</i>	1,82% ± 2,07%	1,75% ± 1,48%	0,579	
<i>Fusobacteriaceae</i>	0,48% ± 2,24%	0,60% ± 2,01%	0,276	
<i>Victivallaceae</i>	0,40% ± 0,78%	0,26% ± 0,57%	0,461	
<i>Alcaligenaceae</i>	2,03% ± 2,38%	1,28% ± 1,69%	0,052	
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,52% ± 0,54%	0,32% ± 0,27%	0,330	
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,81% ± 2,47%	2,27% ± 6,61%	0,336	
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,00% ± 2,32%	0,67% ± 0,93%	0,934	
<i>Pasteurellaceae</i>	0,06% ± 0,11%	0,11% ± 0,26%	0,351	
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0,07% ± 0,10%	0,01% ± 0,02%	0,0004	0,0096

Figura 13 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria a em nível de família em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca.

Na análise dos níveis de gêneros apresentados na Tabela 11 e Figura 14, foi observada na redução na abundância de *Blautia* e *Bilophila* e aumento de *Dialister* na forma cardíaca quando comparada ao grupo controle. A redução de *Blautia* está de acordo com a Tabela 10 que apresentou redução da família *Lachnospiraceae*; vale ressaltar que esta diferença foi perdida após a correção de Bonferroni. A família *Desulfovibrionaceae*, apesar de não ter um valor estatístico significativo, apresentou menor nível de abundância do gênero *Bilophila*. O aumento do gênero *Dialister* está de acordo com os resultados da Tabela 10, que apresenta maior abundância da família *Veillonellaceae* nos cardíacos, se comparados com os controles.

Além disso, também foi observado redução do gênero *Akkermansia* na forma cardíaca da doença, com valor de p significativo, mesmo após a correção de Bonferroni, corroborando

com os resultados das Tabelas 8, 9 e 10, que apresentam menor abundância do filo Verrucomicrobia, da classe Verrucomicrobiae e da família *Verrucomicrobiaceae*.

Tabela 11 - Abundância relativa de Bacteria em nível de gênero de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca. *Diferença estatisticamente significativa *p<0,05 (Mann Withney).

Gênero	Controle	Cardíaco	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Bifidobacterium</i>	0,50% ± 0,56%	0,60% ± 0,86%	0,839	
<i>Bacteroides</i>	25,92% ± 19,80%	16,33% ± 14,59%	0,061	
<i>Parabacteroides</i>	0,59% ± 0,67%	0,50% ± 0,48%	0,501	
<i>Prevotella</i>	11,22% ± 16,53%	19,56% ± 23,91%	0,251	
<i>Butyricimonas</i>	0,37% ± 0,39%	0,24% ± 0,31%	0,114	
<i>Odoribacter</i>	0,49% ± 0,53%	0,38% ± 0,66%	0,162	
<i>Paraprevotella</i>	0,25% ± 0,48%	0,20% ± 0,26%	0,245	
<i>Lactobacillus</i>	0,38% ± 1,03%	0,13% ± 0,18%	0,547	
<i>Streptococcus</i>	0,81% ± 1,70%	0,76% ± 1,27%	0,234	
<i>Turicibacter</i>	0,06% ± 0,12%	0,11% ± 0,36%	0,141	
<i>Clostridium</i>	0,08% ± 0,22%	0,07% ± 0,10%	0,421	
<i>Blautia</i>	2,26% ± 1,67%	1,37% ± 1,33%	0,0045	0,135
<i>Coprococcus</i>	1,65% ± 1,41%	1,18% ± 1,02%	0,135	
<i>Dorea</i>	0,93% ± 0,83%	0,83% ± 0,58%	0,676	
<i>Lachnospira</i>	0,93% ± 0,53%	1,04% ± 1,04%	0,588	
<i>Roseburia</i>	1,53% ± 1,18%	1,91% ± 3,94%	0,076	
<i>Faecalibacterium</i>	10,89% ± 8,09%	10,69% ± 9,76%	0,554	
<i>Oscillospira</i>	0,41% ± 0,22%	0,36% ± 0,24%	0,302	
<i>Ruminococcus</i>	2,33% ± 2,76%	2,74% ± 3,28%	0,925	
<i>Dialister</i>	0,66% ± 1,08%	1,24% ± 1,71%	0,048	1
<i>Mitsuokella</i>	0,05% ± 0,12%	0,07% ± 0,29%	0,323	
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,08% ± 0,10%	0,06% ± 0,12%	0,096	
<i>Catenibacterium</i>	0,16% ± 0,22%	0,13% ± 0,27%	0,873	
<i>Fusobacterium</i>	0,48% ± 2,24%	0,60% ± 2,01%	0,276	
<i>Sutterella</i>	2,03% ± 2,38%	1,27% ± 1,69%	0,051	
<i>Bilophila</i>	0,15% ± 0,12%	0,09% ± 0,11%	0,034	1
<i>Desulfovibrio</i>	0,36% ± 0,53%	0,22% ± 0,25%	0,868	
<i>Succinivibrio</i>	0,81% ± 2,47%	2,27% ± 6,61%	0,332	
<i>Haemophilus</i>	0,06% ± 0,10%	0,11% ± 0,25%	0,457	
<i>Akkermansia</i>	0,07% ± 0,10%	0,01% ± 0,02%	0,0004	0,012

Figura 14 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma cardíaca.

Não foram observadas diferenças na riqueza, na alfa e na beta diversidade da microbiota de fezes entre pacientes controles e com a forma cardíaca da doença de Chagas. No entanto, a comparação da microbiota das fezes desses grupos permitiu determinar que os pacientes com a doença na forma cardíaca apresentam alteração da microbiota intestinal, caracterizada principalmente pela redução do filo Verrucomicrobia na forma cardíaca, a qual teve um valor significativo, mesmo após a correção de Bonferroni, e da classe Verrucomicrobiae, da família *Verrucomicrobiaceae* e do gênero *Akkermansia*, pertencentes a este filo, que apesar de apresentarem uma proporção menor que 0,1% se mantiveram estatisticamente significantes após a correção de Bonferroni.

Outras alterações também foram observadas, como redução da abundância da família *Bacteroidaceae* e da família *Alcaligenelaceae/Suterellaceae*, representada principalmente pelo gênero *Suterella*; redução da abundância relativa da família *Rikenellaceae* e dos gêneros *Bilophila* e *Blautia*, embora em menores proporções, e aumento da abundância relativa da família *Veillonellaceae*, representada principalmente pelo gênero *Dialister*.

4.4. Análise do grupo controle vs Megacólon

A curva de rarefação para amostras de fezes de pacientes controles e com a forma de megacólon da doença de Chagas está ilustrada na Figura 15 e mostra que o número de leituras realizado foi suficiente para determinar a diversidade microbiana das amostras.

Figura 15 - Curvas de rarefação demonstrando o número estimado de OTUs no grupo controle e na forma de megacólon em função do esforço de sequenciamento gerado através da plataforma QIIME.

A Alfa diversidade analisada através da estimativa de riqueza Chao1, índice de Shannon, índice de diversidade de Simpson e número de espécies observadas não demonstrou diferenças significativas intra amostras no grupo controle e portadores da forma de megacólon, como demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Estimativa da diversidade alfa entre o grupo controle e a forma de megacólon da doença de Chagas.

	Controle	Megacólon	valor de p*
Estimativa de riqueza Chao1	521	529	0,627
Índice de Shannon	5.33	5.3	0,775
Índice de diversidade de Simpson	0.92	0.92	0,886
Número de espécies observadas	435	453	0,457

* valor de p – calculado utilizando o método *Mann-Whitney U-test*.

Na figura 16, está ilustrada a análise da beta diversidade taxonômica entre populações, realizada através do método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac ponderada e não ponderada. Foi observado que não houve uma variação da comunidade bacteriana nas amostras de fezes de pacientes controles comparados com a forma de megacólon da doença de Chagas na PCoA ponderada (Figura 16a), mas uma pequena tendência na PCoA não ponderada (Figura 16b) em separar os dois grupos.

Para confirmar estes resultados, foi realizada, através do software QIIME, a análise estatística ANOSIM - método não paramétrico - que é baseada em matriz de distância, obtendo um valor de p 0,20 para a análise da PCoA ponderada e de p 0,04 para a análise da PCoA não ponderada, apresentando esta uma diferença significativa entre os dois grupos.

Figura 16 - Análise da comunidade bacteriana nas amostras de fezes pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ponderada (a) e não ponderada (b) na forma de megacólon e controle.

4.4.1. Análise da taxa de abundância relativa

Os dados de abundância relativa em nível de filo nos pacientes controles e com a forma clínica de megacólon da doença de Chagas estão apresentados na Tabela 13 e Figura 17. Os filos mais abundantes, tanto nos controles como no grupo com megacólon, foram Firmicutes e Bacteroidetes, com um rateio de 2,08 para o grupo controle e 1,50 para o grupo com megacólon, sugerindo tendência à redução de Bacteroidetes nas amostras de fezes do grupo com megacólon e uma pequena alteração da microbiota em direção à Firmicutes.

Tabela 13 - Abundância relativa de Bacteria em nível de filo de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma de megacólon. *Diferença estatisticamente significativa * $p < 0,05$ (Mann Withney).

Filo	Controle	Megacólon	Valor de p*
Actinobacteria	0,56 % $\pm$ 0,57 %	0,65 % $\pm$ 0,60 %	0,668
Bacteroidetes	40,99 % $\pm$ 18,52 %	44,46 % $\pm$ 18,47 %	0,689
Cyanobacteria	0,06 % $\pm$ 0,09 %	0,23 % $\pm$ 0,34 %	0,872
Firmicutes	51,44 % $\pm$ 17,81 %	47,49 % $\pm$ 13,81 %	0,492
Lentisphaerae	0,39 % $\pm$ 0,78 %	0,88 % $\pm$ 1,49 %	0,456
Proteobacteria	5,06 % $\pm$ 4,07 %	3,04 % $\pm$ 2,42 %	0,188
Tenericutes	0,88 % $\pm$ 1,28 %	2,99 % $\pm$ 3,81 %	0,165
Verrucomicrobia	0,08 % $\pm$ 0,10 %	0,16 % $\pm$ 0,20 %	0,476

Figura 17 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de filo em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma megacólon.

Os dados sobre a abundância relativa de bactéria em nível de classe estão apresentados na Tabela 14. Apesar de não terem sido demonstradas diferenças na abundância do filo Proteobacteria entre os grupos (Tabela 13), foi observada uma alteração da microbiota nos pacientes com a forma de megacólon da doença, com redução da classe

Betaproteobacteria de maneira similar à observada quando foram analisadas as amostras de pacientes com a forma cardíaca da doença.

Tabela 14 - Abundância relativa de Bacteria em nível de classe de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma de megacólon. *Diferença estatisticamente significativa * $p < 0,05$ (Mann Withney).

Classe	Controle	Megacólon	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
Actinobacteria	0,51 % $\pm$ 0,56 %	0,56 % $\pm$ 0,56 %	0,898	
Coriobacteriia	0,05 % $\pm$ 0,04 %	0,09 % $\pm$ 0,09 %	0,898	
Bacteroidia	40,99 % $\pm$ 18,53 %	44,46 % $\pm$ 18,47 %	0,678	
Bacilli	1,51 % $\pm$ 2,87 %	0,57 % $\pm$ 0,56 %	0,501	
Clostridia	48,12 % $\pm$ 17,53 %	44,81 % $\pm$ 13,42 %	0,742	
Erysipelotrichi	1,81 % $\pm$ 2,07 %	2,11 % $\pm$ 2,25 %	0,830	
Fusobacteriia	0,48 % $\pm$ 2,24 %	0,04 % $\pm$ 0,11 %	0,232	
Lentisphaeria	0,39 % $\pm$ 0,78 %	0,88 % $\pm$ 1,49 %	0,440	
Alphaproteobacteria	0,64 % $\pm$ 1,71 %	0,12 % $\pm$ 0,36 %	0,140	
Betaproteobacteria	2,04 % $\pm$ 2,37 %	0,89 % $\pm$ 1,06 %	0,014	0,196
Deltaproteobacteria	0,52 % $\pm$ 0,54 %	0,58 % $\pm$ 0,54 %	0,699	
Gammaproteobacteria	1,87 % $\pm$ 3,44 %	1,45 % $\pm$ 2,55 %	0,678	
Mollicutes	0,83 % $\pm$ 1,24 %	2,92 % $\pm$ 3,78 %	0,133	
Verrucomicrobiae	0,07 % $\pm$ 0,10 %	0,08 % $\pm$ 0,11 %	0,965

Figura 18 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de classe em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma megacólon.

Em amostras de fezes de pacientes com a forma clínica megacólon, foi observado aumento da abundância relativa da família *Porphyromonadaceae*, redução não significativa da abundância relativa de *Bacteroidaceae* e aumento de *Prevotellaceae* em relação ao controle, como demonstrado nos pacientes com a forma cardíaca da doença. É interessante notar também que as amostras de pacientes com a forma clínica de megacólon apresentaram menor abundância da família *Lachnospiraceae*, organismos pertencentes ao filo Firmicutes. Além disso, também de maneira similar ao observado em amostras de pacientes com a forma cardíaca da doença, a maior abundância de Betaproteobacteria nas fezes de pacientes com a forma clínica megacólon, ocorreu devido à maior abundância da família *Alcaligenelaceae/ Suterellaceae*.

Tabela 15 - Abundância relativa de Bacteria em nível de família de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma de megacólon. *Diferença estatisticamente significativa * $p < 0,05$ (Mann Withney).

Família	Controle	Megacólon	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Bifidobacteriaceae</i>	050, % $\pm$ 0,56 %	0,55 % $\pm$ 0,56 %	0,943	1
<i>Coriobacteriaceae</i>	0, 05% $\pm$ 0,04 %	0,09 % $\pm$ 0,09 %	0,898	
<i>Bacteroidaceae</i>	26,00 % $\pm$ 19,87 %	21,63 % $\pm$ 15,73 %	0,617	
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,59 % $\pm$ 0,67 %	1,03 % $\pm$ 0,75 %	0,044	
<i>Prevotellaceae</i>	11,26 % $\pm$ 16,50 %	16,56 % $\pm$ 19,78 %	0,920	
<i>Rikenellaceae</i>	0,37 % $\pm$ 0, 38%	0,44 % $\pm$ 0,35 %	0,353	
<i>Barnesiellaceae</i>	0,24 % $\pm$ 0,31 %	0,47 % $\pm$ 0,67 %	0,501	
<i>Odoribacteraceae</i>	0, 86% $\pm$ 0,65 %	1,21 % $\pm$ 0,83 %	0,183	
<i>Paraprevotellaceae</i>	1,26 % $\pm$ 2,20 %	1,70 % $\pm$ 4,36 %	0,657	
<i>Lactobacillaceae</i>	0,38 % $\pm$ 1,03 %	011, % $\pm$ 0, 18%	0,353	
<i>Leuconostocaceae</i>	0,21 % $\pm$ 0,61 %	0,02 % $\pm$ 0,02 %	0,448	
<i>Streptococcaceae</i>	0, 84% $\pm$ 1,74 %	0,36 % $\pm$ 0,39 %	0,898	
<i>Christensenellaceae</i>	0,13 % $\pm$ 0,25 %	1,93 % $\pm$ 5,13 %	0,097	
<i>Lachnospiraceae</i>	17,30 % $\pm$ 6,79 %	11,59 % $\pm$ 3,77 %	0,005	0,125
<i>Ruminococcaceae</i>	22, 88% $\pm$ 11,03 %	19,82 % $\pm$ 8,10 %	0,415	
<i>Veillonellaceae</i>	0,82 % $\pm$ 1,12 %	0,62 % $\pm$ 0,71 %	0,597	

Família	Controle	Megacólon	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Mogibacteriaceae</i>	0,06 % ± 0,05 %	0,07 % ± 0,08 %	0,830	0,275
<i>Erysipelotrichaceae</i>	1,81 % ± 2,07 %	2,11 % ± 2,25 %	0,830	
<i>Victivallaceae</i>	0,39 % ± 0,78 %	0,88 % ± 1,49 %	0,440	
<i>Alcaligenaceae/Sutterellaceae</i>	2,03 % ± 2,37 %	0,87 % ± 1,06 %	0,011	
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,52 % ± 0,54 %	0,58 % ± 0,54 %	0,699	
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,81 % ± 2,47 %	0,01 % ± 0,02 %	0,635	
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,00 % ± 2,32 %	1,33 % ± 2,57 %	0,338	
<i>Pasteurellaceae</i>	0,06 % ± 0,11 %	0,10 % ± 0,25 %	0,819	
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0,07 % ± 0,10 %	0,08 % ± 0,11 %	0,965

Figura 19 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bactéria em nível de família em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma megacólon.

Em nível de gênero, foi observada uma diminuição do gênero *Parabacteroides* devido ao aumento da família *Porphyromonadaceae*, dos gêneros *Blautia*, *Dorea*,

Roseburia e *Lachnospira* no grupo megacólon, relacionados à redução da família *Lachnospiraceae*. E também uma diminuição de *Sutterella* devido à redução da família *Suterellaceae*.

Tabela 16 - Abundância relativa de Bacteria em nível de gênero de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e da forma de megacólon. *Diferença estatisticamente significativa *p<0,05 (Mann Withney).

Gênero	Controle	Megacólon	valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Bifidobacterium</i>	0,50 % ± 0,56 %	0,55 % ± 0,56 %	0,897	
<i>Bacteroides</i>	26,00 % ± 19,87 %	21,63 % ± 15,73 %	0,627	
<i>Parabacteroides</i>	0,59 % ± 0,67 %	1,03 % ± 0,75 %	0,039	1
<i>Prevotella</i>	11,26 % ± 16,50 %	16,56% ± 19,78 %	0,932	
<i>Butyrlicimonas</i>	0,37 % ± 0,39 %	0,56 % ± 0,50 %	0,289	
<i>Odoribacter</i>	0,49 % ± 0,53 %	0,65 % ± 0,44 %	0,183	
<i>Paraprevotella</i>	0,25 % ± 0,48 %	0,24 % ± 0,24 %	0,386	
<i>Lactobacillus</i>	0,38 % ± 1,03 %	0,11 % ± 0,18 %	0,349	
<i>Streptococcus</i>	080, % ± 1,69 %	0,29 % ± 0,31 %	1	
<i>Clostridium</i>	0,25 % ± 0,34 %	0,09 % ± 0,04 %	0,977	
<i>Blautia</i>	2,25 % ± 1,67 %	1,18 % ± 0,51 %	0,030	0,870
<i>Coprococcus</i>	1,65 % ± 1,40 %	1,34 % ± 1,17 %	0,510	
<i>Dorea</i>	0,93 % ± 0,83 %	0,48 % ± 0,34 %	0,010	0,269
<i>Lachnospira</i>	0,92 % ± 0,53 %	0,68 % ± 0,88 %	0,035	1
<i>Roseburia</i>	1,66 % ± 1,15 %	0,99 % ± 1,26 %	0,024	0,696
<i>Ruminococcus</i>	0,56 % ± 0,32 %	0,47 % ± 0,44 %	0,264	
<i>Faecalibacterium</i>	13,27 % ± 8,15 %	10,72 % ± 6,42 %	0,391	
<i>Oscillospira</i>	0, 43% ± 0,22 %	0,47 % ± 0,37 %	0,886	
<i>Ruminococcus</i>	2,31 % ± 2,76 %	1,81 % ± 1,43 %	0,954	
<i>Dialister</i>	0,65 % ± 1,07 %	0,52 % ± 0,74 %	0,729	
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,08 % ± 0,09 %	0,06 % ± 0,07 %	0,794	
<i>Catenibacterium</i>	0,16 % ± 0,22 %	005, % ± 0,08 %	0,182	
<i>Eubacterium</i>	1,08 % ± 1,86 %	0,58 % ± 1,02 %	0,24	
<i>Sutterella</i>	2,03 % ± 2,38 %	0,87 % ± 1,06 %	0,011	0,316
<i>Bilophila</i>	0,15 % ± 0,12 %	0,13 % ± 0,14 %	0,510	
<i>Desulfovibrio</i>	0,36 % ± 0,53 %	0,45 % ± 0,43 %	0,336	
<i>Haemophilus</i>	0,06 % ± 0,10 %	0,10 % ± 0,25 %	0,828	
<i>Akkermansia</i>	0,07 % ± 0,10 %	0,08 % ± 0,11 %	0,906

Figura 20 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da forma megacólon.

Não foram observadas diferenças na riqueza e alfa diversidade da microbiota de fezes entre pacientes controles e com a forma de megacólon da doença de Chagas. No entanto, a análise da beta diversidade mostrou diferenças significantes entre os dois grupos quando a análise foi realizada avaliando-se a abundância de OTUs - PCoA não ponderada - e não o seu número - PcoA ponderada. O aspecto mais relevante observado quando se analisou o microbioma de fezes de pacientes com megacólon em relação ao controle foi a diminuição da família Lachnospiraceae, o que ocorreu devido à redução dos gêneros *Blautia*, *Dorea*, *Roseburia* e *Lachnospira* nestas amostras, como apresentado na Tabela 16.

Além do aumento da abundância relativa do gênero *Parabacteroides* devido à redução da família *Porphyromonadaceae* e, de maneira similar, ao observado nas amostras de pacientes com a forma cardíaca da doença, também na forma clínica megacólon, foi observada redução de Betaproteobacteria representada pela redução da Família *Suterellaceae*, gênero *Suterella*.

4.5. Análise do microbioma nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas: indeterminada, cardíaca, megacólon e de controles saudáveis.

A curva de rarefação para amostras de fezes de pacientes controles e com as formas indeterminada, cardíaca e digestiva (megacólon) da doença de Chagas está ilustrada na Figura 21 e mostra que o número de leituras realizado foi suficiente para determinar a diversidade microbiana das amostras.

Figura 21 - Curvas de rarefação demonstrando o número estimado de OTUs no grupo controle e nas formas indeterminada, cardíaca e megacólon em função do esforço de sequenciamento gerado através da plataforma QIIME.

A alfa diversidade analisada através da estimativa de riqueza Chao1, índice de Shannon, índice de diversidade de Simpson e número de espécies observadas não

demonstrou diferenças significativas intra amostras no grupo controle e com as formas indeterminada, cardíaca e digestiva (megacólon) da doença de Chagas, como demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17 - Estimativa da diversidade alfa entre o grupo controle e as formas indeterminada, cardíaca e megacólon.

	Controle	Indeterminado	Cardíaco	Megacólon	Valor de p *
Estimativa de riqueza Chao1	588	555	540	591	0,629
Índice de Shannon	5,37	5,44	5,05	5,34	0,519
Índice de diversidade de Simpson	0,93	0,92	0,89	0,92	0,626
Número de espécies observadas	477	461	424	496	0,418

* valor de p – calculado utilizando o método de *Kruskal Wallis*.

Na figura 22, está ilustrada a análise da beta diversidade - diversidade taxonômica entre populações, realizada através do método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac ponderada e não ponderada. Foi observado que não houve variação da comunidade bacteriana nas amostras de fezes de pacientes controles comparados com as formas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas na PCoA ponderada (Figura 22a), mas uma pequena tendência na PCoA não ponderada (Figura 22b) em separar os quatro grupos.

Para confirmar estes resultados, foi realizada, através do software QIIME, a análise estatística ANOSIM - método não paramétrico - baseada em matriz de distância, obtendo um valor de p 0,17 para a análise da PCoA ponderada e de p 0,01 para a análise da PCoA não ponderada, apresentando esta diferença significativa entre os quatro grupos.

Figura 22 - Análise da comunidade bacteriana nas amostras de fezes pelo método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ponderada (a) e não ponderada (b) no grupo controle e nas formas indeterminada, cardíaca e megacólon.

4.5.1. Análise da taxa de abundância relativa

Os dados de abundância relativa em nível de filo nos pacientes controles e com as formas clínica de Chagas indeterminada, cardíaca e megacólon estão apresentados na Tabela 18 e Figura 23. Os filos mais abundantes foram Firmicutes e Bacteroidetes, com um rateio de 2,08 para o grupo controle, 2,94 para o grupo indeterminado, 3,40 para o grupo cardíaco e de 1,50 para o grupo com megacólon.

A única diferença significativa entre os grupos foi referente ao filo Verrucomicrobia que, apesar da sua abundância relativa ser menor que 1% nos quatro grupos, apresentou menor proporção na forma cardíaca como já observado anteriormente. Esta diferença se manteve estaticamente significativa após a correção de Bonferroni.

Tabela 18 - Abundância relativa de Bactéria em nível de filo de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e das formas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas. *Diferença estatisticamente significante *p<0,05 (Mann Withney).

Filo	Controle	Indeterminado	Cardíaco	Megacólon	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
Actinobacteria	0,56%±0,57%	1,05%±1,11%	0,65%±0,87%	0,65%±0,60%	0,234	
Bacteroidetes	40,95%±18,52%	31,88%±16,43%	39,11%±22,92%	44,45%±13,82%	0,203	
Firmicutes	51,46%±17,80%	56,78%±17,39%	53,01%±24,48%	47,48%±13,82%	0,404	
Fusobacteria	0,48%±2,24%	1,49%±8,05%	0,60%±2,01%	0,04%±0,11%	0,237	
Lentisphaerae	0,39%±0,78%	0,54%±0,99%	0,26%±0,57%	0,88%±1,49%	0,485	
Proteobacteria	5,06%±4,07%	6,10%±8,67%	4,70%±6,88%	3,03%±2,42%	0,409	
Tenericutes	0,90%±1,30%	1,81%±3,40%	1,43%±3,08%	3,00%±3,82%	0,460	
Verrucomicrobia	0,08%±0,10%	0,07%±0,09%	0,02%±0,04%	0,16%±0,20%	0,006	0,046

Figura 23 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de filo em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e das formas indeterminada, cardíaca e megacólon.

Os dados sobre a abundância relativa das classes estão apresentados na Tabela 19 e na Figura 24. Apesar de não terem sido demonstradas diferenças na abundância do filo Proteobacteria entre os grupos (Tabela 18), observou-se alteração na classe Betaproteobacteria, com redução no grupo de megacólon e aumento no de controle, como também visto anteriormente na comparação da forma de megacólon com o grupo controle.

Tabela 19 - Abundância relativa de Bactéria em nível de classe de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e das formas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas. *Diferença estatisticamente significativa *p<0,05 (Mann Withney).

Classe	Controle	Indeterminado	Cardíaco	Megacólon	Valor de p de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
Actinobacteria	0,51%±0,56%	1,00%±1,10%	0,61%±0,86%	0,56%±0,56%	0,228	
Coriobacteriia	0,05%±0,04%	0,05%±0,04%	0,04%±0,04%	0,09%±0,09%	0,746	
Bacteroidia	40,95%±18,52%	31,88%±16,43%	39,11%±22,92%	44,45%±18,48%	0,203	
4C0d-2	0,06%±0,09%	0,17%±0,30%	0,18%±0,35%	0,23%±0,34%	0,833	
Bacilli	1,51%±2,86%	1,75%±2,61%	1,28%±1,84%	0,56%±0,55%	0,388	
Clostridia	48,12%±17,52%	52,38%±16,57%	49,98%±24,12%	44,81%±3,43%	0,461	
Erysipelotrichi	1,81%±2,07%	2,64%±2,77%	1,75%±1,47%	2,11%±2,25%	0,505	
Fusobacteriia	0,48%±2,24%	1,49%±8,05%	0,60%±2,01%	0,04%±0,11	0,238	
Lentisphaeria	0,39%±0,78%	0,54%±0,99%	0,26%±0,57%	0,88%±1,49%	0,485	
Alphaproteobacteria	0,64%±1,71%	0,15%±0,42%	0,02%±0,05%	0,12%±0,36%	0,112	
Betaproteobacteria	2,04%±2,37%	1,31%±2,38%	1,29%±1,69%	0,88%±1,05%	0,012	0,182
Deltaproteobacteria	0,51%±0,54%	0,45%±0,66%	0,32%±0,27%	0,58%±0,54%	0,547	
Gammaproteobacteria	1,87%±3,44%	4,18%±8,64%	3,07%±6,73%	1,45%±2,55%	0,797	
Mollicutes	0,85%±1,26%	1,65%±3,30%	1,01%±1,80%	2,93%±3,79%	0,411	
RF3	0,06%±0,13%	0,17%±0,64%	0,43%±2,21%	0,07%±0,10%	0,515

Figura 24 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de classe em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e das formas indeterminada, cardíaca e megacólon.

A menor abundância de Betaproteobacteria nas amostras com megacólon (Tabela 19) foi principalmente devido à redução da família *Alcaligenaceae/Sutterellaceae* nestas amostras em relação às de pacientes com as formas indeterminada, cardíaca e com o grupo controle (Tabela 20). Também foi observado um aumento na abundância relativa das famílias *Rickenellaceae* e *Odoribacteraceae* nas amostras de pacientes com megacólon em relação às formas indeterminadas, cardíaca e ao grupo controle, o que está relacionado ao aumento da classe *Bacteroidia* em megacólon quando comparado aos outros grupos.

Apesar de não ter sido observada nenhuma alteração na abundância do filo Firmicutes (Tabela 18) e da classe Clostridia (Tabela 19), a família *Lachnospiraceae* (Tabela 20) apresentou diminuição na forma de megacólon em relação aos outros grupos analisados, como também observado anteriormente na comparação entre a forma de megacólon com o grupo controle.

Tabela 20 - Abundância relativa de Bactéria em nível de família de amostras de fezes de pacientes do grupo controle e das formas clínicas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas. *Diferença estatisticamente significante *p<0,05 (Mann Withney).

Família	Controle	Indeterminado	Cardíaco	Megacólon	Valor de p*	Valor de p Bonferroni
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,50%±0,56%	0,98%±1,10%	0,60%±0,86%	0,55%±0,56%	0,254	
<i>Coriobacteriaceae</i>	0,05%±0,04%	0,05%±0,04%	0,04%±0,04%	0,09%±0,09%	0,747	
<i>Bacteroidaceae</i>	25,90%±19,78%	15,27%±14,28%	16,33%±14,58%	21,47%±15,47%	0,089	
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,59%±0,67%	0,55%±0,51%	0,50%±0,48%	1,03%±0,75%	0,096	
<i>Prevotellaceae</i>	11,25%±16,49%	13,26%±15,57%	19,61%±23,92%	16,56%±19,78%	0,618	
<i>Rikenellaceae</i>	0,44%±0,52%	0,34%±0,53%	0,23%±0,36%	0,61%±0,49%	0,009	0,27
<i>S24-7</i>	0,29%±0,47%	0,36%±0,78%	0,51%±0,89%	0,60%±1,00%	0,834	
<i>Barnesiellaceae</i>	0,24%±0,31%	0,29%±0,53%	0,14%±0,27%	0,47%±0,66%	0,197	
<i>Odoribacteraceae</i>	0,86%±0,74%	0,77%±0,77%	0,61%±0,93%	1,21%±0,83%	0,024	0,711
<i>Paraprevotellaceae</i>	1,26%±2,21%	0,69%±0,89%	1,05%±1,35%	1,70%±4,36%	0,762	
<i>Enterococcaceae</i>	0,02%±0,03%	0,11%±0,54%	0,02%±0,02%	0,06%±0,12%	0,436	
<i>Lactobacillaceae</i>	0,38%±1,03%	0,47%±0,60%	0,13%±0,18%	0,11%±0,18%	0,285	
<i>Leuconostocaceae</i>	0,21%±0,61%	0,24%±0,77%	0,23%±0,80%	0,02%±0,02%	0,703	
<i>Streptococcaceae</i>	0,84%±1,74%	0,90%±1,52%	0,79%±1,30%	0,35%±0,37%	0,676	
<i>Turicibacteraceae</i>	0,06%±0,12%	0,02%±0,04%	0,11%±0,36%	0,01%±0,02%	0,246	
<i>Christensenellaceae</i>	0,13%±0,25%	0,21%±0,27%	0,14%±0,19%	1,93%±5,13%	0,135	
<i>Clostridiaceae</i>	0,73%±0,82%	1,22%±2,21%	0,68%±0,76%	0,46%±0,26%	0,501	
<i>Lachnospiraceae</i>	17,33%±6,83%	19,15%±9,49%	15,58%±10,28%	11,65%±3,72%	0,021	0,639
<i>Peptococcaceae</i>	0,04%±0,05%	0,07%±0,09%	0,07%±0,10%	0,02%±0,03%	0,275	
<i>Ruminococcaceae</i>	22,88%±11,03%	23,00%±9,90%	26,97%±22,12%	19,83%±8,13%	0,858	
<i>Veillonellaceae</i>	0,82%±1,12%	0,81%±1,15%	1,44%±1,80%	0,62%±0,71%	0,132	
<i>Mogibacteriaceae</i>	0,06%±0,05%	0,07%±0,07%	0,04%±0,03%	0,07%±0,08%	0,268	
<i>Erysipelotrichaceae</i>	1,81%±2,07%	2,64%±2,77%	1,75%±1,47%	2,11%±2,25%	0,505	

Família	Controle	Indeterminado	Cardíaco	Megacólon	Valor de p*	Valor de p Correção de Bonferroni
<i>Fusobacteriaceae</i>	0,48%±2,24%	1,49%±8,05%	0,60%±2,01%	0,04%±0,11%	0,245	
<i>Victivallaceae</i>	0,39%±0,78%	0,52%±0,97%	0,26%±0,57%	0,88%±1,49%	0,295	
<i>Alcaligenaceae</i>	2,02%±2,38%	1,30%±2,38%	1,27%±1,69%	0,87%±1,05%	0,011	0,339
<i>Desulfotribionaceae</i>	0,51%±0,54%	0,45%±0,66%	0,32%±0,27%	0,58%±0,54%	0,534	
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,80%±2,47%	3,60%±8,70%	2,27%±6,60%	0,01%±0,02%	0,474	
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,00%±2,31%	0,44%±0,53%	0,66%±0,92%	1,33%±2,57%	0,684	
<i>Pasteurellaceae</i>	0,06%±0,11%	0,15%±0,40%	0,11%±0,26%	0,10%±0,25%	0,723

Figura 25 - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria em nível de família em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e das formas clínicas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas.

Em nível de gênero, foi observado que *Blautia* e *Dialister* tinham menor abundância em megacólon, o que corrobora com a menor proporção do filo Firmicutes e das famílias *Lachnospiraceae* e *Veillonellaceae* nesta forma clínica, apesar de não apresentarem diferença significativa. Outros gêneros encontrados em menor proporção em megacólon foram a *Bilophila*, que se deve à redução do filo Proteobacteria, apesar de também não apresentar uma diferença significativa e a *Suterella*, que está relacionado à redução da classe Betaproteobacteria e da família *Alcaligenaceae/Suterellaceae*.

Tabela 21 - Abundância relativa de Bactéria em nível de gênero de amostras de fezes de pacientes do grupo de controle e das formas clínicas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas. *Diferença estatisticamente significativa *p<0,05 (Mann Withney).

Gênero	Controle	Indeterminado	Cardíaco	Megacólon	Valor de p*	Valor de p de Bonferroni
<i>Bifidobacterium</i>	0,50%±0,56%	0,98%±1,10%	0,59%±0,86%	0,55%±0,56%	0,254	
<i>Bacteroides</i>	25,90%±19,78%	15,27%±14,28%	16,33%±14,58%	21,47%±15,74%	0,090	
<i>Parabacteroides</i>	0,59%±0,67%	0,55%±0,51%	0,50%±0,48%	1,03%±0,75%	0,095	
<i>Prevotella</i>	11,25%±16,49%	13,26%±15,57%	19,61%±23,92%	16,56%±19,78%	0,618	
<i>Butyricimonas</i>	0,37%±0,39%	0,30%±0,35%	0,23%±0,31%	0,56%±0,50%	0,071	
<i>Odoribacter</i>	0,49%±0,53%	0,47%±0,57%	0,38%±0,66%	0,65%±0,44%	0,138	
<i>CF231</i>	0,03%±0,13%	0,04%±0,19%	0,06%±0,31%	0,25%±0,79%	0,496	
<i>Paraprevotella</i>	0,25%±0,48%	0,21%±0,26%	0,20%±0,27%	0,24%±0,24%	0,603	
<i>Lactobacillus</i>	0,38%±1,03%	0,45%±0,61%	0,13%±0,18%	0,11%±0,18%	0,475	
<i>Streptococcus</i>	0,80%±1,69%	0,86%±1,51%	0,75%±1,27%	0,29%±0,31%	0,625	
<i>Turicibacter</i>	0,06%±0,12%	0,02%±0,04%	0,11%±0,36%	0,01%±0,02%	0,246	
<i>Clostridium</i>	0,09%±0,22%	0,10%±0,26%	0,08%±0,10%	0,03%±0,02%	0,669	
<i>Anaerostipes</i>	0,16%±0,45%	0,04%±0,07%	0,06%±0,10%	0,04%±0,05%	0,445	
<i>Blautia</i>	2,25%±1,67%	1,76%±1,01%	1,36%±1,32%	1,18%±0,51%	0,010	0,343
<i>Coproccoccus</i>	1,65%±1,41%	1,44%±0,95%	1,18%±1,02%	1,34%±1,18%	0,423	
<i>Dorea</i>	0,92%±0,83%	0,80%±0,59%	0,83%±0,57%	0,48%±0,34%	0,129	
<i>Lachnospira</i>	0,92%±0,53%	1,01%±0,66%	1,04%±1,04%	0,69%±0,89±%	0,228	
<i>Roseburia</i>	1,85%±1,17%	2,21%±2,98%	2,20%±4,04%	1,12%±1,30%	0,083	
<i>Faecalibacterium</i>	13,04%±8,01%	12,91%±8,30%	13,68%±12,33%	10,63%±6,33%	0,851	
<i>Oscillospira</i>	0,44%±0,22%	0,41%±0,25%	0,40%±0,31%	0,48%±0,37%	0,642	
<i>Ruminococcus</i>	2,30%±2,76%	1,86%±1,37%	2,65%±3,25%	1,83%±1,44%	0,994	

Gênero	Controle	Indeterminado	Cardíaco	Megacólon	Valor de p*	Valor de p de Bonferroni
<i>Dialister</i>	0,65%±1,07%	0,56%±1,08%	1,24%±1,71%	0,52%±0,74%	0,039	1
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,08%±0,09%	0,07%±0,07%	0,06%±0,12%	0,06%±0,07%	0,137	
<i>Catenibacterium</i>	0,16%±0,22%	0,23%±0,32%	0,13%±0,27%	0,05%±0,08%	0,399	
<i>RFN20</i>	0,11%±0,57%	0,13%±0,45%	0,06%±0,23%	0,55%±1,16%	0,187	
<i>Eubacterium</i>	1,08%±1,86%	1,88%±2,54%	0,93%±1,19%	0,58%±1,02%	0,185	
<i>Fusobacterium</i>	0,48%±2,24%	1,49%±8,05%	0,60%±2,01%	0,04%±0,11%	0,295	
<i>Sutterella</i>	2,02%±2,38%	1,30%±2,38%	1,27%±1,69%	0,87%±1,05%	0,011	0,376
<i>Bifidobacterium</i>	0,15%±0,12%	0,08%±0,17%	0,09%±0,11%	0,13%±0,14%	0,008	0,277
<i>Desulfovibrio</i>	0,36%±0,53%	0,36%±0,65%	0,22%±0,25%	0,45%±0,43%	0,597	
<i>Succinivibrio</i>	0,80%±2,47%	3,58%±8,74%	2,27%±6,60%	0,01%±0,01%	0,350	
<i>Haemophilus</i>	0,06%±0,10%	0,13%±0,37%	0,11%±0,25%	0,10%±0,25%	0,777

Figura 26 - Abundância relativa e classificação taxonômica de bactéria em nível de gênero em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e das formas clínicas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas.

Não foram observadas diferenças na riqueza e na diversidade da microbiota das fezes entre pacientes controles e com as formas indeterminada, cardíaca e megacólon da doença de Chagas; no entanto, a análise da beta diversidade mostrou diferenças significantes entre os grupos quando a análise foi realizada avaliando-se a abundância de OTUs - PCoA não ponderada - e não o seu número - PCoA ponderada. A comparação da microbiota de fezes desses grupos permitiu determinar que os pacientes com a doença na forma de megacólon apresentaram maiores alterações da microbiota intestinal, caracterizadas pela redução do filo Verrucomicrobia, da classe Betaproteobacteria e dos gêneros *Blautia*, *Dialister* e *Bilophila* e pelo aumento das famílias *Rickenellaceae* e *Odoribacteraceae*. Porém, na forma cardíaca, foi observada diferença significativa, mesmo

após a correção de Bonferroni do filo Verrucomicrobia, apesar da sua abundância relativa ser menor que 1% em todos os grupos.

4. Discussão

Apesar das extensas diferenças nos quadros clínicos de pacientes com doença de Chagas^{10, 15, 16} incluindo alterações intestinais, a composição da microbiota residente nestes pacientes e sua relação com as manifestações clínicas, ainda são parcamente entendidas. Este é o primeiro estudo que buscou descrever a microbiota intestinal dos pacientes com as diversas formas da doença de Chagas usando tecnologia de sequenciamento de nova geração.

Recentemente, MacCall et al.¹³⁷ analisaram a microbiota murina e seus metabólitos após camundongos serem infectados com culturas de tripomastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* na fase aguda e na crônica. Uma alteração da microbiota fecal, juntamente com seus metabólitos, foi observada, principalmente nos membros das famílias *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* relacionadas com derivadas do ácido linoleico conjugado (CLA), cujos produtos do metabolismo alteram a resposta inflamatória intestinal através do recrutamento de células T regulatórias, diminuindo a expressão do receptor TNF e a produção de TNF α , aumentando a citocina anti-inflamatória TGF β do cólon. Assim, esses metabólitos podem promover um ambiente intestinal que favoreça a presença do *T. cruzi* e as funções do intestino. Também foi observada a alteração de alguns membros da ordem Clostridiales juntamente com ácidos secundários da bile, uma vez que o metabolismo do ácido biliar pela microbiota intestinal, segundo estudos, está relacionado com a inflamação do cólon e com a saúde em geral, podendo afetar a patogênese da doença de Chagas¹³⁸. Essas significantes alterações das bactérias e de seus metabólitos foram observadas no 14º dia após a infecção, o que coincide com a indução da resposta imune adaptativa contra o *T. cruzi*, sugerindo um papel imune mediado em sua destruição. Assim,

os resultados observados neste estudo com modelos murinos sugerem que a infecção pelo *T. cruzi* modula a microbiota fecal e a que interação microbiota hospedeiro também pode estar envolvida na patogênese da doença de Chagas e não somente o *T. cruzi*, pois os metabólicos das bactérias podem causar alterações no ambiente intestinal afetando a resposta inflamatória do hospedeiro.

No nosso estudo, não observamos alteração na família *Ruminococcaceae* e de membros da ordem Clostridiales; contudo, pode-se notar menor abundância da *Lachnospiraceae* na forma de megacólon quando comparada ao controle, mas esta alteração não foi significativa após a correção de Bonferroni; porém, não podemos comparar fidedignamente os resultados deste estudo com o nosso, pois neste, investigamos o microbioma de pacientes diagnosticados como chagásicos por décadas, enquanto que no estudo com modelo murino, a alteração da microbiota foi observada no 14º dia após a infecção, além do fato de a microbiota de camundongos não representar fielmente a de humanos.

Nossos dados mostraram algumas diferenças na proporção de alguns grupos bacterianos das diversas formas da doença, porém, estas diferenças não se mantiveram após a correção de Bonferroni, com exceção do filo Verrucomicrobia, que apesar de estar em proporção menor que 1%, foi significativamente menor na forma cardíaca, mesmo após a correção por múltiplos testes. Este é um filo recentemente descrito, ainda com poucas espécies e é, portanto, difícil saber se este achado tem alguma implicação na fisiopatologia da doença. Existe apenas um relato sugerindo que este filo aumenta após o uso de antibióticos.¹³⁹ A redução do nível deste filo também foi observada na comparação entre mulheres grávidas saudáveis no começo, meio e fim da gravidez. No final da gestação, a

Verrucomicrobia quase desapareceu, sugerindo que a mudança da microbiota intestinal é um resultado da capacidade de digestão do corpo em resposta à alta necessidade de energia e metabolismo nesta fase.¹⁴⁰ Recentemente, a presença da bactéria *Akkermansia muciniphila*, que faz parte do filo Verrucomicrobia, foi associada à melhor resposta clínica: a imunoterapia com PD1 em pacientes com câncer de pulmão e rim. A administração desta bactéria em camundongos com microbiota não favorável restaurou a atividade antitumor da imunoterapia.¹⁴¹ Os autores acreditam que este efeito seja devido ao fato de que esta bactéria induz à produção de IL-12 favorecendo a resposta antitumor. Interessante notar que a IL-12 também é importante na resposta imune ao *T cruzi*.¹⁶

A. muciniphila também foi inversamente associada com obesidade, diabetes, doença cardiometabólica e inflamação.¹⁴² A administração de *A. muciniphila* vivas por dia em um modelo murino foi capaz de proteger parcialmente a obesidade induzida por dieta.¹⁴³

Os filos mais encontrados na microbiota intestinal saudável são Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria.¹⁴⁴ Alteração em suas proporções podem causar patologias; por exemplo, na síndrome do intestino irritável (IBS) e na obesidade foram observados aumento de Firmicutes e redução da abundância de Bacteroides.¹⁴⁴ Em nosso estudo, não encontramos diferenças na abundância destes filos entre controles e as diversas formas clínicas da doença de Chagas.

Ao usar a correção de Bonferroni, podemos perder associações verdadeiras por falta de poder, uma vez que a casuística é pequena. O número de pacientes em cada grupo foi baseado em outros estudos de microbiota e não em um cálculo amostral formal. Isto

porque ainda não existe uma forma consensual para calcular o tamanho de amostra em estudos de microbiota.

Comparando-se controle com pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas foram encontradas alterações pontuais em níveis taxonômicos diversos; por exemplo, a forma indeterminada apresentou menor abundância do filo da classe Betaproteobacteria, da família *Alcaligenaceae/Sutterellaceae* do gênero *Suterella*. O papel deste gênero frequentemente associa-se a doenças humanas como o autismo, a Síndrome de Down, e a doença inflamatória do intestino; no entanto, o impacto dessa bactéria sobre a saúde ainda não está claro.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ Em nível de gênero, também foi observada redução de *Bilophila*. *Bilophila* é uma bactéria imunogênica, redutora de sulfito, sendo dificilmente encontrada em indivíduos saudáveis e também está associada a condições patológicas como apendicite, doenças inflamatórias do intestino e em dietas com altos níveis de gordura saturada derivada do leite.¹⁴⁹⁻¹⁵¹

Apesar da abundância similar em Bacteroidetes entre controle e forma indeterminada, pode ser observada significativa redução da abundância relativa da família *Bacteroidaceae*, representada principalmente pelo gênero *Bacteroides* na forma indeterminada.

A redução de Bacteroidetes foi relacionada à disbiose da microbiota intestinal em diferentes condições. Por exemplo, na síndrome do intestino inflamado, foi observada abundância similar no filo Bacteroidetes em relação aos controles, porém com uma significativa redução do gênero *Bacteroides*.¹⁵² Concluindo, a análise da comparação da microbiota de indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas demonstrou ser

semelhante à microbiota de controles saudáveis, destacando-se apenas a redução da abundância do filo Bacteroides e de alguns dos seus membros.

Não foram encontradas diferenças significantes intra e inter amostras do grupo controle comparado com o cardíaco. Além do filo Verrucomicrobia que manteve a associação após correção de Bonferroni, alguns outros grupos bacterianos tiveram a sua proporção diferente entre estas duas formas: por exemplo, as classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria -pertencentes ao filo Proteobacteria - estavam diminuídas na forma cardíaca. Esse filo é encontrado em pequenas proporções na flora de indivíduos saudáveis e um aumento de sua prevalência foi relacionado a um potencial diagnóstico de disbiose intestinal e de risco a doenças como desordens metabólicas, inflamação e câncer.¹⁵³ Porém, não existe nenhum estudo que indique que a sua diminuição possa estar associada à disbiose.

As famílias *Rikenellaceae* e *Bacteroidaceae* foram mais abundantes nos controles enquanto a *Veillonellaceae* foi mais abundante na forma cardíaca.

As *Rikenellaceae* são bactérias comensais do intestino. Estudos com obesos e indivíduos com dietas altamente calóricas relataram maior abundância desta família em seus organismos.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷

A família *Veillonellaceae* foi mais abundante na forma cardíaca, principalmente devido ao aumento do gênero *Dialister*. A abundância deste gênero na microbiota intestinal foi associada à inflamação do íleo e cólon de pacientes com Espondilite Anquilosante¹⁵⁸ e com menor tolerância à glicose.¹⁵⁹ Por outro lado, foi relatada a redução de *Dialister invisus* em pacientes com doença de Chron, associada à redução de bactérias

reconhecidamente benéficas como *Faecalibacterium prausnitzii* e *Bifidobacterium adolescentes*.¹⁶⁰

Os gêneros *Blautia* e *Bilophila* tiveram sua abundância relativa maior nos controles do que na forma cardíaca. A *Bilophila*, uma bactéria imunogênica redutora de sulfito, dificilmente encontrada em indivíduos saudáveis, é associada a condições patológicas como apendicite, doenças inflamatórias do intestino e em dietas com altos níveis de gordura saturada.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ A *Blautia* apresentou menor abundância em pacientes em tratamento com uso de antibiótico que inibem bactéria anaeróbica e também nos portadores da doença do enxerto contra o hospedeiro.¹⁶¹

Assim, a análise da microbiota associada à forma cardíaca em doença de Chagas sugere disbiose, com redução da abundância da família *Veillonellace* e do seu gênero *Dialister*, destacando-se pela redução do filo *Verrucomicrobia* que apresentou um valor de *p* significativo, mesmo após a correção de Bonferroni.

A análise da diversidade microbiana intestinal de pacientes com megacólon e controle revelou variações pontuais em diferentes níveis taxonômicos.

Entre as famílias do filo *Bacteroidetes*, a *Porphyromonadaceae* estava aumentada nos casos de megacólon. Esta família parece ter papel protetor no intestino e a sua abundância decresce em camundongos suscetíveis à colite induzida por patógenos como *Salmonella* e por *Citrobacter rodentium*.¹⁶²

Entre membros do filo *Proteobacteria*, foi observada redução da abundância das classes *Betaproteobacteria* no megacólon quando comparada com o controle. Entre as *Betaproteobacteria*, a família *Alcaligenaceae* (*Sutterellaceae*), gênero *Sutterella* apresentou redução em megacólon.

Entre as famílias do filo Firmicutes que apresentaram redução na abundância nas amostras com megacólon destaca-se a família *Lachnospiraceae*. Membros da família *Lachnospiraceae* produzem butirato e/ou piruvato como produto final do catabolismo de carboidratos.¹⁶³⁻¹⁶⁵ O butirato, um ácido graxo de cadeia curta o qual fornece energia para as células do cólon¹⁶⁶, exerce efeito positivo sobre a superfície da microbiota intestinal¹⁶⁷, estimula a diferenciação das células epiteliais, auxilia o controle regulatório do sistema digestivo do hospedeiro e apresenta efeito anti-inflamatório, incluindo dois mecanismos importantes que são: a inibição da ativação do fator nuclear Kappa B e de acetilação de histonas.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

Análises metagenômicas das amostras fecais de pacientes com diabetes, demonstraram que tais pacientes possuíam baixos níveis de bactérias produtoras de butirato em comparação controles saudáveis.¹⁷¹ Além disso, a redução dessa bactéria pode apresentar implicações no sistema nervoso entérico e na mobilidade intestinal.¹⁶⁹

Na família *Porphuromonadaceae*, foi observada maior abundância relativa do gênero *Parabacteroides* no grupo com a forma clínica de megacólon. Este aumento também foi observado na microbiota de pessoas hipertensas e em crianças com eczema.^{172,}
173

Dentro da família *Lachospiraceae*, a abundância relativa dos gêneros *Dorea*, *Blautia*, *Lachnospira* e *Roseburia* foi maior nas fezes do grupo controle comparado com o megacólon. Outras patologias também apresentaram níveis mais baixos de membros da família *Lachnospiraceae* como a encefalopatia hepática (HE) que é um modelo de eixo intestino-fígado-cérebro prejudicado na cirrose. Com a progressão dessa doença, foi relatada disbiose com redução da abundância da taxa de autóctones como *Lachnospiraceae*,

Ruminococcaceae e *Clostridiales* XIV e aumento de *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae*, sendo estas alterações da microbiota associadas com a cognição prejudicada, endotoxemia e inflamação.¹⁷⁴

A redução da abundância do gênero *Roseburia* também foi associada a doenças intestinais, como a síndrome do intestino irritado,¹⁵² ao mesmo tempo o *Blautia* estava diminuído na forma cardíaca, e como foi mencionado anteriormente, a abundância relativa deste gênero esteve reduzida em tratamento com uso de antibiótico que inibe bactéria anaeróbica e também na doença do enxerto contra o hospedeiro.¹⁶¹

Assim, a análise da microbiota associado à forma megacólon da doença de Chagas sugeriu uma possível disbiose da microbiota com redução de membros da família *Lachnospiraceae*.

5. Conclusões

Nosso estudo descreveu a microbiota de pacientes com a doença de Chagas comparando com indivíduos saudáveis. As comunidades microbianas foram semelhantes aos controles não infectados, com exceção do filo Verrucomicrobia cuja frequência relativa esteve significativamente menor na forma cardíaca, sugerindo que esta bactéria possa estar envolvida na resposta imunológica. Porém, ainda não existem muitos estudos envolvendo esta bactéria e seus componentes, o que não nos permite entender este mecanismo.

7. Anexos

Anexo 1: Parecer da comissão de ética para análise de projetos de pesquisa – CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: “ESTUDO DO MICROBIOMA DE PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS”
Pesquisador Responsável: Ester Cerdeira Sabino **Versão:** 2
Pesquisador Executante: Marcela de Souza **CAAE:** 34762614.2.0000.0068
Coautores: Léa Campos de Oliveira
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Ester Cerdeira Sabino
Instituição: HCFMUSP
Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12612
Número do Parecer: 1.174.958
Data da Relatoria: 05/08/2015
Apresentação do Projeto: Adequada. Emenda para inclusão do centro: Hospital Emilio Ribas
Objetivo da Pesquisa: Descrever a microbiota intestinal de acordo com a forma clínica da doença de Chagas, através da amplificação do gene 16s RNA ribossomal.
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Mínimos riscos e não há benefícios diretos para o paciente. O estudo poderá conhecer melhor a microbiota intestinal.
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo da microbiota em pacientes com a forma digestiva e a forma cardíaca para determinar as diferenças em relação a controles negativos pode revelar se essa alteração é um fator de estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias.
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados.
Recomendações: Não há.
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.
Situação do Parecer: Aprovado.
Necessita Apreciação da CONEP: Não.

São Paulo, 05 de Agosto de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo 2: Termos de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD ()

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Microbioma de pacientes portadores da doença de Chagas.

2. PESQUISADORA: Ester Cerdeira Sabino

CARGO/FUNÇÃO:

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº51785

UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar deste estudo porque anteriormente participou do estudo **“História natural da doença de Chagas e achados laboratoriais em doadores de sangue brasileiro com anticorpos positivos para *Trypanosoma cruzi*”**

O presente estudo pretende entender quais são as bactérias no seu intestino e se isso tem relação com o desenvolvimento da doença de Chagas.

Caso o Sr(a) concorde em participar nos iremos marcar um dia para o Sr(a) vir a Faculdade de Medicina para coleta de 30 mL de sangue e fezes. O Sr(a) também irá responder um questionário sobre a sua saúde. Este procedimento não deverá tomar mais de 30 minutos do seu tempo.

Caso o Sr(a) não consiga coletar fezes no momento da visita, iremos lhe entregar um coletor contendo um conservante (este coletor com instruções poderá ser enviado por correio antes de sua vinda). Este conservante é tóxico e por este motivo o frasco deverá ser mantido fora do alcance de crianças e deverá ser aberto apenas no momento de uso.

O estudo não implicará em riscos diretos ao Sr.(a), uma vez que os procedimentos aos quais será submetido constituem instrumentos normatizados para a identificação laboratorial do microbioma intestinal. Os resultados desta pesquisa não terão benefício direto ao seu tratamento mas poderão ajudar a entender melhor a doença de Chagas.

A coleta de sangue será feita por punção de uma veia no antebraço. O desconforto é o de uma picada de agulha e o risco de formação de hematoma no local. Não há risco ou desconforto relacionado à coleta de fezes.

As suas amostras poderão ser doadas ao biobanco do Instituto de Medicina tropical para futuros estudos. O Sr receberá um consentimento específico para este fim.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Sendo sua participação voluntária, o Sr.(a) não terá nenhum prejuízo, caso não queira participar, e também poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis. Sempre que quiser tirar suas dúvidas com relação aos aspectos éticos, fazer denúncias ou reclamações sobre o Projeto de Pesquisa de sua participação, entrar em contato, através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário, através do email, telefone ou endereço do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este documento é emitido em duas vias idênticas, ficando uma via com o Sr.(a) e uma via com a pesquisadora.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Profa Dra Ester Cerdeira Sabino, que pode ser encontrada no endereço Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 470, prédio II –1º andar –Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Telefone(s) 3061 8702 Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida

pelo orçamento da pesquisa. O Sr(a) receberá de volta apenas o dinheiro que gastou com transporte para chegar até aqui e para voltar para casa (no máximo de R\$ 20,00).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo do microbioma de pacientes portadores da Doença de Chagas”

Eu discuti com a Dra Ester Cerdeira Sabino sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorde voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD ()

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Microbioma de pacientes portadores da doença de Chagas.

2. PESQUISADORA: Ester Cerdeira Sabino

CARGO/FUNÇÃO:

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº51785

UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO

☐

RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar deste estudo porque o Sr foi diagnosticado com megacolon devido a doença de Chagas

O presente estudo pretende entender quais são as bactérias no seu intestino e se isso tem relação com o desenvolvimento da doença de Chagas.

Caso o Sr(a) concorde em participar nos iremos marcar um dia para o Sr(a) vir a Faculdade de Medicina para coleta de 30 mL de sangue e fezes. O Sr(a) também irá responder um questionário sobre a sua saúde. Este procedimento não deverá tomar mais de 30 minutos do seu tempo.

Caso o Sr(a) não consiga coletar fezes no momento da visita, iremos lhe entregar um coletor contendo um conservante (este coletor com instruções poderá ser enviado por correio antes de sua vinda). Este conservante é tóxico e por este motivo o frasco deverá ser mantido fora do alcance de crianças e deverá ser aberto apenas no momento de uso.

O estudo não implicará em riscos diretos ao Sr.(a), uma vez que os procedimentos aos quais será submetido constituem instrumentos normatizados para a identificação laboratorial do microbioma intestinal. Os resultados desta pesquisa não terão benefício direto ao seu tratamento mas poderão ajudar a entender melhor a doença de Chagas.

A coleta de sangue será feita por punção de uma veia no antebraço. O desconforto é o de uma picada de agulha e o risco de formação de hematoma no local. Não há risco ou desconforto relacionado à coleta de fezes.

As suas amostras poderão ser doadas ao biobanco do Instituto de Medicina tropical para futuros estudos. O Sr receberá um consentimento específico para este fim.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Sendo sua participação voluntária, o Sr.(a) não terá nenhum prejuízo, caso não queira participar, e também poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis. Sempre que quiser tirar suas dúvidas com relação aos aspectos éticos, fazer denúncias ou reclamações sobre o Projeto de Pesquisa de sua participação, entrar em contato, através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário, através do email, telefone ou endereço do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este documento é emitido em duas vias idênticas, ficando uma via com o Sr.(a) e uma via com a pesquisadora.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Profa Dra Ester Cerdeira Sabino, que pode ser encontrada no endereço Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 470, prédio II –1º andar –Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Telefone(s) 3061 8702 Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida

pelo orçamento da pesquisa. O Sr(a) receberá de volta apenas o dinheiro que gastou com transporte para chegar até aqui e para voltar para casa (no máximo de R\$ 20,00).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo do microbioma de pacientes portadores da Doença de Chagas”

Eu discuti com a Dra Ester Cerdeira Sabino sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS
SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD ()

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Microbioma de pacientes portadores da doença de Chagas.

2. PESQUISADORA: Ester Cerdeira Sabino

CARGO/FUNÇÃO:

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº51785:

UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO

☐

RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar deste estudo porque o Sr foi diagnosticado com megacolon devido a doença de Chagas

O presente estudo pretende entender quais são as bactérias no seu intestino e se isso tem relação com o desenvolvimento da doença de Chagas.

Caso o Sr(a) concorde em participar nos iremos marcar um dia para o Sr(a) vir a Faculdade de Medicina para coleta de 30 mL de sangue e fezes. O Sr(a) também irá responder um questionário sobre a sua saúde. Este procedimento não deverá tomar mais de 30 minutos do seu tempo.

Caso o Sr(a) não consiga coletar fezes no momento da visita, iremos lhe entregar um coletor contendo um conservante (este coletor com instruções poderá ser enviado por correio antes de sua vinda). Este conservante é tóxico e por este motivo o frasco deverá ser mantido fora do alcance de crianças e deverá ser aberto apenas no momento de uso.

O estudo não implicará em riscos diretos ao Sr.(a), uma vez que os procedimentos aos quais será submetido constituem instrumentos normatizados para a identificação laboratorial do microbioma intestinal. Os resultados desta pesquisa não terão benefício direto ao seu tratamento mas poderão ajudar a entender melhor a doença de Chagas.

A coleta de sangue será feita por punção de uma veia no antebraço. O desconforto é o de uma picada de agulha e o risco de formação de hematoma no local. Não há risco ou desconforto relacionado à coleta de fezes.

As suas amostras poderão ser doadas ao biobanco do Instituto de Medicina tropical para futuros estudos. O Sr receberá um consentimento específico para este fim.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Sendo sua participação voluntária, o Sr.(a) não terá nenhum prejuízo, caso não queira participar, e também poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis. Sempre que quiser tirar suas dúvidas com relação aos aspectos éticos, fazer denúncias ou reclamações sobre o Projeto de Pesquisa de sua participação, entrar em contato, através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário, através do email, telefone ou endereço do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este documento é emitido em duas vias idênticas, ficando uma via com o Sr.(a) e uma via com a pesquisadora.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Profa Dra Ester Cerdeira Sabino, que pode ser encontrada no endereço Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 470, prédio II –1º andar –Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Telefone(s) (11) 3061 8702 Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661- 6442 ramais 16, 17, 18, ou (11) 2661-7585; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. O Sr(a) receberá de volta apenas o dinheiro que gastou com transporte para chegar até aqui e para voltar para casa (no máximo de RS 20,00).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo do microbioma de pacientes portadores da Doença de Chagas”

Eu discuti com a Dra Ester Cerdeira Sabino sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

8. Referências Bibliográficas

1. Pereira Neves D, Lane De Melo A, Marcos Linardi P, W. Almeida Vitor R. Parasitologia Humana. 12ª ed. São Paulo: Atheneu; 2012.
2. Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002.
3. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90:33-43.
4. Pinto Dias JC. Human chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. *J Trop Med.* 2013;2013:789758.
5. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373:1882.
6. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375:1388-402.
7. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases – Summary. *Wkly Epidemiol Rec.* 2011;86:113-20.
8. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010;115:5-13.
9. Ferreira LR, Ferreira FM, Nakaya HI, Deng X, Cândido DD, de Oliveira LC, Billaud JN, Lanteri MC, Rigaud VO, Seielstad M, Kalil J, Fernandes F, Ribeiro AL, Sabino EC, Cunha-Neto E. Blood Gene Signatures of Chagas Cardiomyopathy With or Without Ventricular Dysfunction. *J Infect Dis.* 2017;215:387-95.
10. Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J.* 2006;82:788-98.
11. Lana M TW. *Trypanossoma cruzi* e Doença de Chagas. 10ª ed. Neves DP MA, Genaro O, Linardi PM. Rio de Janeiro: Atheneu; 2003.
12. Tobler LH, Contestable P, Pitina L, Groth H, Shaffer S, Blackburn GR, Warren H, Lee SR, Busch MP. Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chagas antibody in US blood donors. *Transfusion.* 2007;47:90-6.
13. Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, del Pozo A, Sands A, Vercauteren G, Sabino EC. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion.* 2009;49:1076-82.
14. Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:463-91.
15. Gironès N, Carrasco-Marin E, Cuervo H, Guerrero NA, Sanoja C, John S, Flores-Herráez R, Fernández-Prieto L, Chico-Calero I, Salgado H, Carrión J, Fresno M. Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1107:434-44.
16. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115:1109-23.
17. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:683230.
18. Meneghelli UG. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37:252-60.
19. Mott KE, Hagstrom JW. The Pathologic lesions of the cardiac autonomic nervous system in chronic Chagas' myocarditis. *Circulation.* 1965;31:273-86.
20. Oliveira JS. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. *Am Heart J.* 1985;110:1092-8.

21. Ribeiro dos Santos, Hudson L. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol*. 1981;44:349-54.
22. Ribeiro dos Santos R, Marquez JO, Von Gal Furtado CC, Ramos de Oliveira JC, Martins AR, Köberle F. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed Parasitol*. 1979;30:19-23.
23. Miziara HL, Santos BG, Lopes ERL, Tafuri WL, Chapadeiro E. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1911;3:276-94.
24. CM T. Miocitólise e fibrose do miocárdio na doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1960;58:161-82.
25. Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 1956;14:1035-60.
26. Andrade ZA, Andrade SG. Pathogenesis of Chagas' chronic myocarditis; importance of ischemic lesions. *Arq Bras Med*. 1955;45:279-88.
27. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001;31:550-4.
28. Ben Younès-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Tricottet V, Eisen H, Reynes M, Said G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82:77-83.
29. Higuchi MeL, De Brito T, Martins Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993;2:101-6.
30. Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48:348-57.
31. Bellotti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi M L, Barbero-Marcial M, Sosa E, Esteves-Filho A, Kalil R, Weiss R, Jatene A, Pileggi F. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J*. 1996;131:301-7.
32. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:726-32.
33. MF F. Experimental carditis induced by *Trypanosoma cruzi* (y strain) in guinea pigs: correlation between histopathology and the presence of T cruzi antigens identified by indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1990;23:187-89.
34. Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis*. 1999;180:480-6.
35. Olivares-Villagómez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:563-70.
36. Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000;94:571-9.
37. Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86:187-200.
38. Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of

experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1521-8.

39. Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol.* 2003;19:447-51.
40. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 2006;39:41-54.
41. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 2002;18:262-5.
42. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 2001;17:99-107.
43. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003;71:1185-93.
44. Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci.* 2007;12:2797-806.
45. da Silveira AB, de Araújo FF, Freitas MA, Gomes JA, Chaves AT, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, da Cunha Souza G, Bernardino Júnior R, Fujiwara R, d'Avila Reis D, Correa-Oliveira R. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol.* 2009;70:65-7.
46. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Cardoso MR, Braga PE, Faé KC, Nunes VL, Buck P, Mady C, Kalil J, Goldberg AC. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect.* 2006;8:598-603.
47. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:407-11.
48. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature.* 2012;489:250-6.
49. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005;307:1915-20.
50. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* 2009;136:65-80.
51. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006;312:1355-9.
52. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14:e1002533.
53. Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr.* 1972;25:1292-4.
54. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 2012;489:242-9.
55. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9:577-89.
56. Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:151-70.
57. Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 2017;66:515-22.

58. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489:220-30.
59. Cummings JH, Gibson GR, Macfarlane GT. Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man. *Acta Vet Scand Suppl*. 1989;86:76-82.
60. Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, Flint HJ. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:3593-9.
61. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:121-31.
62. Fischbach MA, Sonnenburg JL. Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host Microbe*. 2011;10:336-47.
63. Sheridan PO, Martin JC, Lawley TD, Browne HP, Harris HM, Bernalier-Donadille A, Duncan SH, O'Toole PW, Scott KP, Flint HJ. Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic. *Microb Genom*. 2016;2:e000043.
64. Patrascu O, Béguet-Crespel F, Marinelli L, Le Chatelier E, Abraham AL, Leclerc M, Klopp C, Terrapon N, Henrissat B, Blottière HM, Doré J, Béra-Maillet C. A fibrolytic potential in the human ileum mucosal microbiota revealed by functional metagenomic. *Sci Rep*. 2017;7:40248.
65. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001;81:1031-64.
66. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol*. 2010;12:304-14.
67. Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1997;21:357-65.
68. Morotomi M, Mutai M. In vitro binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J Natl Cancer Inst*. 1986;77:195-201.
69. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, Kim CJ, Erez O, Edwin S, Relman DA. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008;3:e3056.
70. Romero R, Miranda J, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Martinez A, Gotsch F, Dong Z, Ahmed AI, Shaman M, Lannaman K, Yoon BH, Hassan SS, Kim CJ, Korzeniewski SJ, Yeo L, Kim YM. Clinical chorioamnionitis at term I: microbiology of the amniotic cavity using cultivation and molecular techniques. *J Perinat Med*. 2015;43:19-36.
71. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol*. 2005;51:270-4.
72. Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, Watson M, Katancik J, Garcia N, Patel S, Cutting M, Madden T, Hamilton H, Harris E, Gevers D, Simone G, McInnes P, Versalovic J. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J*. 2013;27:1012-22.
73. Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, Fernández L, Rodríguez JM, Jiménez E. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 2013;8:e66986.
74. Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy*. 2013;43:198-211.

75. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050.
76. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4578-85.
77. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:11971-5.
78. Decker E, Hornef M, Stockinger S. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Gut Microbes*. 2011;2:91-8.
79. Renz-Polster H, David MR, Buist AS, Vollmer WM, O'Connor EA, Frazier EA, Wall MA. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1466-72.
80. Bergström A, Skov TH, Bahl MI, Roager HM, Christensen LB, Ejlerskov KT, Mølgaard C, Michaelsen KF, Licht TR. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:2889-900.
81. Mitsuoka T. Development of functional foods. *Biosci Microbiota Food Health*. 2014;33:117-28.
82. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H, Khan MT, Zhang J, Li J, Xiao L, Al-Aama J, Zhang D, Lee YS, Kotowska D, Colding C, Tremaroli V, Yin Y, Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, Dahlgren J, Wang J. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015;17:852.
83. Dogra S, Sakwinska O, Soh SE, Ngom-Bru C, Brück WM, Berger B, Brüssow H, Lee YS, Yap F, Chong YS, Godfrey KM, Holbrook JD, Group GS. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *MBio*. 2015;6.
84. Dogra S, Sakwinska O, Soh SE, Ngom-Bru C, Brück WM, Berger B, Brüssow H, Karnani N, Lee YS, Yap F, Chong YS, Godfrey KM, Holbrook JD. Rate of establishing the gut microbiota in infancy has consequences for future health. *Gut Microbes*. 2015;6:321-5.
85. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486:222-7.
86. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerster KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P, Consortium M. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473:174-80.
87. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K,

- Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4586-91.
88. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*. 2010;5:e10667.
89. Cani PD. Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. *Brief Funct Genomics*. 2013;12:381-7.
90. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:321-35.
91. Vogtmann E, Goedert JJ. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br J Cancer*. 2016;114:237-42.
92. Sokol H, Lepage P, Seksik P, Doré J, Marteau P. Molecular comparison of dominant microbiota associated with injured versus healthy mucosa in ulcerative colitis. *Gut*. 2007;56:152-4.
93. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1183-9.
94. Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskis L, Doré J, Raedler A, Schreiber S. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2011;141:227-36.
95. Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*. 2016;158:52-62.
96. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*. 2010;5:e9085.
97. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. 2010;16:444-53.
98. Finegold SM, Downes J, Summanen PH. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*. 2012;18:260-2.
99. Mezzelani A, Landini M, Facchiano F, Raggi ME, Villa L, Molteni M, De Santis B, Brera C, Caroli AM, Milanesi L, Marabotti A. Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: a translational hypothesis for regressive autism pathogenesis. *Nutr Neurosci*. 2015;18:145-61.
100. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:6459-65.
101. Finegold SM. Therapy and epidemiology of autism--clostridial spores as key elements. *Med Hypotheses*. 2008;70:508-11.
102. Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol*. 1974;27:961-79.
103. Valverde JR, Mellado RP. Analysis of metagenomic data containing high biodiversity levels. *PLoS One*. 2013;8:e58118.
104. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 2016;17:135.

105. Poretsky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One*. 2014;9:e93827.
106. Mizrahi-Man O, Davenport ER, Gilad Y. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PLoS One*. 2013;8:e53608.
107. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*. 2003;55:541-55.
108. Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11:442-6.
109. Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009;4:e7401.
110. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:5261-7.
111. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M, Group NHW. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19:2317-23.
112. Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One*. 2014;9:e105592.
113. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341.
114. Vogel U, Szczepanowski R, Claus H, Jünemann S, Prior K, Harmsen D. Ion torrent personal genome machine sequencing for genomic typing of *Neisseria meningitidis* for rapid determination of multiple layers of typing information. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1889-94.
115. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364.
116. Milani C, Hevia A, Feroni E, Duranti S, Turrone F, Lugli GA, Sanchez B, Martín R, Gueimonde M, van Sinderen D, Margolles A, Ventura M. Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One*. 2013;8:e68739.
117. White AG, Watts GS, Lu Z, Meza-Montenegro MM, Lutz EA, Harber P, Burgess JL. Environmental arsenic exposure and microbiota in induced sputum. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11:2299-313.
118. Jünemann S, Prior K, Szczepanowski R, Harks I, Ehmke B, Goesmann A, Stoye J, Harmsen D. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One*. 2012;7:e41606.
119. Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, Geuking MB, Lawson MA, Wyss M, Brugiroux S, Keller I, Macpherson JA, Rupp S, Stolp B, Stein JV, Stecher B, Sauer U, McCoy KD, Macpherson AJ. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun*. 2015;6:8292.
120. Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1204-8.

121. Plummer E, Twin J, Bulach DM, Garland SM, Tabrizi SN. A Comparison of Three Bioinformatics Pipelines for the Analysis of Preterm Gut Microbiota using 16S rRNA Gene Sequencing Data. *J Proteomics Bioinform*. 2015;8:283-91.
122. Villarino NF, LeCleir GR, Denny JE, Dearth SP, Harding CL, Sloan SS, Gribble JL, Campagna SR, Wilhelm SW, Schmidt NW. Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:2235-40.
123. Gilchrist CA, Petri SE, Schneider BN, Reichman DJ, Jiang N, Begum S, Watanabe K, Jansen CS, Elliott KP, Burgess SL, Ma JZ, Alam M, Kabir M, Haque R, Petri WA. Role of the Gut Microbiota of Children in Diarrhea Due to the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*. 2016;213:1579-85.
124. Duarte R, Silva AM, Vieira LQ, Afonso LC, Nicoli JR. Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Med Microbiol*. 2004;53:741-8.
125. Duarte R, Silva AM, Vieira LQ, Afonso LC, Nicoli JR. *Trypanosoma cruzi*: influence of predominant bacteria from indigenous digestive microbiota on experimental infection in mice. *Exp Parasitol*. 2005;111:87-96.
126. Sabino EC, Lee TH, Montalvo L, Nguyen ML, Leiby DA, Carrick DM, Otani MM, Vinelli E, Wright D, Stramer SL, Busch M, Program NREDS-IR-II. Antibody levels correlate with detection of *Trypanosoma cruzi* DNA by sensitive polymerase chain reaction assays in seropositive blood donors and possible resolution of infection over time. *Transfusion*. 2013;53:1257-65.
127. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4516-22.
128. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7:335-6.
129. Pylro VS, Roesch LF, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods*. 2014;107:30-7.
130. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*. 2013;10:996-8.
131. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D633-42.
132. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:5069-72.
133. Uramoto K, Walder JMM, Zucchi RA. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. *Neotrop Entomol*. 2005;34:33-39.
134. Ferraz A, Gadelha B, Aguiar-Coelho V. Análise faunística de Calliphoridae (Diptera) da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Entomologia*. 2009;53:620-28.

135. Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Microbiol.* 2012;Chapter 1:Unit 1E.5.
136. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:1576-85.
137. McCall LI, Tripathi A, Vargas F, Knight R, Dorrestein PC, Siqueira-Neto JL. Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006344.
138. Gerard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens.* 2013;3:14-24.
139. Dubourg G, Lagier JC, Armougom F, Robert C, Audoly G, Papazian L, Raoult D. High-level colonisation of the human gut by Verrucomicrobia following broad-spectrum antibiotic treatment. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41:149-55.
140. Liu J, Yang H, Yin Z, Jiang X, Zhong H, Qiu D, Zhu F, Li R. Remodeling of the gut microbiota and structural shifts in Preeclampsia patients in South China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:713-19.
141. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP, Fidelle M, Flament C, Poirier-Colame V, Opolon P, Klein C, Iribarren K, Mondragón L, Jacquelot N, Qu B, Ferrere G, Clémenson C, Mezquita L, Masip JR, Naltet C, Brosseau S, Kaderbhai C, Richard C, Rizvi H, Levenez F, Galleron N, Quinquis B, Pons N, Ryffel B, Minard-Colin V, Gonin P, Soria JC, Deutsch E, Lioriot Y, Ghiringhelli F, Zalcman G, Goldwasser F, Escudier B, Hellmann MD, Eggermont A, Raoult D, Albiges L, Kroemer G, Zitvogel L. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.* 2018;359:91-97.
142. Cani PD, de Vos WM. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of Akkermansia muciniphila. *Front Microbiol.* 2017;8:1765.
143. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:9066-71.
144. Hong SN, Rhee PL. Unraveling the ties between irritable bowel syndrome and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol.* 2014;20:2470-81.
145. Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of Sutterella species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *MBio.* 2012;3.
146. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Increased abundance of Sutterella spp. and Ruminococcus torques in feces of children with autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 2013;4:42.
147. Biagi E, Candela M, Centanni M, Consolandi C, Rampelli S, Turrone S, Severgnini M, Peano C, Ghezzi A, Scurti M, Salvioli S, Franceschi C, Brigidi P. Gut microbiome in Down syndrome. *PLoS One.* 2014;9:e112023.
148. Lim MY, You HJ, Yoon HS, Kwon B, Lee JY, Lee S, Song YM, Lee K, Sung J, Ko G. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut.* 2017;66:1031-38.
149. Rowan FE, Docherty NG, Coffey JC, O'Connell PR. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. *Br J Surg.* 2009;96:151-8.

150. Zinkevich V, Beech IB. Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000;34:147-55.
151. Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, Antonopoulos DA, Jabri B, Chang EB. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10^{-/-} mice. *Nature.* 2012;487:104-8.
152. Gobert AP, Sagrestani G, Delmas E, Wilson KT, Verriere TG, Dapoigny M, Del'homme C, Bernalier-Donadille A. The human intestinal microbiota of constipated-predominant irritable bowel syndrome patients exhibits anti-inflammatory properties. *Sci Rep.* 2016;6:39399.
153. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33:496-503.
154. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Ross RP, O'Toole PW, Shanahan F, Cotter PD. Targeting the microbiota to address diet-induced obesity: a time dependent challenge. *PLoS One.* 2013;8:e65790.
155. Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients.* 2011;3:637-82.
156. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One.* 2012;7:e47713.
157. Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czejek M, Michel G. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Front Microbiol.* 2011;2:93.
158. Tito RY, Cypers H, Joossens M, Varkas G, Van Praet L, Glorieus E, Van den Bosch F, De Vos M, Raes J, Elewaut D. Brief Report: Dialister as a Microbial Marker of Disease Activity in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69:114-21.
159. Ciubotaru I, Green SJ, Kukreja S, Barengolts E. Significant differences in fecal microbiota are associated with various stages of glucose tolerance in African American male veterans. *Transl Res.* 2015;166:401-11.
160. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut.* 2011;60:631-7.
161. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, Littmann ER, Ling L, Gobourne AC, Miller LC, Docampo MD, Peled JU, Arpaia N, Cross JR, Peets TK, Lumish MA, Shono Y, Dudakov JA, Poeck H, Hanash AM, Barker JN, Perales MA, Giralto SA, Pamer EG, van den Brink MR. Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1373-83.
162. Brinkman BM, Hildebrand F, Kubica M, Goosens D, Del Favero J, Declercq W, Raes J, Vandenabeele P. Caspase deficiency alters the murine gut microbiome. *Cell Death Dis.* 2011;2:e220.
163. Hedberg ME, Moore ER, Svensson-Stadler L, Hörstedt P, Baranov V, Hernell O, Wai SN, Hammarström S, Hammarström ML. Lachnoanaerobaculum gen. nov., a new genus in the Lachnospiraceae: characterization of Lachnoanaerobaculum umeaense gen. nov., sp. nov., isolated from the human small intestine, and Lachnoanaerobaculum orale sp. nov., isolated from saliva, and reclassification of Eubacterium saburreum (Prevot 1966) Holdeman and Moore 1970 as Lachnoanaerobaculum saburreum comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:2685-90.
164. Scott KP, Martin JC, Duncan SH, Flint HJ. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014;87:30-40.
165. Jalava J, Eerola E. Phylogenetic analysis of Fusobacterium alocis and Fusobacterium sulci based on 16S rRNA gene sequences: proposal of Filifactor alocis (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and Eubacterium sulci (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 4:1375-9.

166. Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*. 1980;21:793-8.
167. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12:661-72.
168. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27:104-19.
169. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol*. 2014;28:1221-38.
170. Li Z, Wrenn BA, Venosa AD. Effect of iron on the sensitivity of hydrogen, acetate, and butyrate metabolism to inhibition by long-chain fatty acids in vegetable-oil-enriched freshwater sediments. *Water Res*. 2005;39:3109-19.
171. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490:55-60.
172. Yan Q, Gu Y, Li X, Yang W, Jia L, Chen C, Han X, Huang Y, Zhao L, Li P, Fang Z, Zhou J, Guan X, Ding Y, Wang S, Khan M, Xin Y, Li S, Ma Y. Alterations of the Gut Microbiome in Hypertension. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:381.
173. Wopereis H, Sim K, Shaw A, Warner JO, Knol J, Kroll JS. Intestinal microbiota in infants at high risk for allergy: Effects of prebiotics and role in eczema development. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:1334-42.e5.
174. Bajaj JS. The role of microbiota in hepatic encephalopathy. *Gut Microbes*. 2014;5:397-403.