



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

A influência da Hidroxiureia no microbioma intestinal em doentes com Anemia das células falciformes

Maria Carolina de Olivença Dias Fernandes

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de
Mestre em **Engenharia Biomédica**

(Versão Definitiva)

Orientador:

Prof. Doutor Rui Miguel Duque Brito (ESTeSL, H&TRC)

Lisboa, Dezembro de 2022

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**A influência da Hidroxiureia no microbioma intestinal em
doentes com Anemia das células falciformes**

Maria Carolina de Olivença Dias Fernandes

Orientador:

Prof. Doutor Rui Miguel Duque Brito (ESTeSL, H&TRC)

Mestrado em **Engenharia Biomédica**

Júri:

Presidente: Prof^a Doutora Cecília R.C. Calado (ISEL)

Arguente: Prof^a Doutora Vanessa Alexandra Pinho Mateus (ESTeSL)

Lisboa, Dezembro de 2022



A influência da Hidroxiureia no microbioma intestinal em doentes com Anemia das células falciformes

Maria Carolina de Olivença Dias Fernandes

Este trabalho foi apoiado pelo projeto de investigação financiado pela FCT / Aga Khan (projeto n.º 330842553). O presente trabalho foi realizado no Centro de Investigação em Saúde & Tecnologia (H&TRC), localizado na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, sob a supervisão direta do Professor Doutor Rui Miguel Duque Brito (ESTeSL).

O Instituto Politécnico de Lisboa tem o direito ilimitado e intemporal de arquivar e publicar esta dissertação através de cópias digitais ou físicas, ou qualquer outro meio que considerem adequado, com objetivos de investigação ou educação, não comerciais, desde que o autor seja reconhecido para tal.

Copyright © 2022 – Maria Carolina Fernandes

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de começar por agradecer à minha família, em especial aos meus pais e irmã, pelo apoio incondicional, carinho e compreensão que me deram ao longo de todo o meu percurso académico e por serem os grandes impulsionadores de todas as minhas conquistas.

Gostaria também de agradecer ao meu orientador Professor Doutor Miguel Brito, por toda a ajuda, disponibilidade, empenho e por todos conselhos que me ofereceu ao longo deste trabalho. Quero prestar também um especial agradecimento à Mariana Delgado pelo seu precioso auxílio no laboratório, pela disponibilidade, ajuda e por toda a paciência durante este último ano. À Professora Luísa Veiga pelo auxílio na realização de algumas técnicas e por toda a disponibilidade. Quero também agradecer às minhas colegas de laboratório por toda a simpatia, disponibilidade e ajuda prestada.

Destaco também um agradecimento ao Centro de Investigação em Saúde & Tecnologia (H&TRC) pelo acolhimento e disponibilização de todos os recursos necessários para a realização do presente estudo. Ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL) e à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) por estes dois anos de muita aprendizagem. Em especial à Professora Doutora Cecília Calado e a todos meus professores, por todo o apoio e por todos os conhecimentos transmitidos que me permitiram crescer.

Por último, quero agradecer a todos os meus amigos e colegas que me acompanharam durante todo o meu percurso académico. Quero deixar um especial agradecimento às minhas amigas Ana Beatriz Serafim, Ana Rita Lopes, Beatriz Canteiro e Raquel Inácio por toda a ajuda, por toda a amizade e por me acompanharem sempre.

Introdução: A doença das células falciformes constitui uma desordem sanguínea monogénica e hereditária, caracterizada pela manifestação de hemoglobina S, a variante mutante da hemoglobina mais prevalente a nível mundial. A anemia falciforme resulta numa homozigotia de hemoglobina S, contribuindo com inúmeras complicações clínicas e podendo afetar a integridade do microbioma intestinal, que desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da doença. A hidroxiureia tem vindo a ser apontada como um potencial modulador de características da anemia falciforme podendo induzir determinados efeitos benéficos no microbioma intestinal.

Objetivos: Análise dos efeitos da hidroxiureia na composição do microbioma intestinal em doentes com anemia das células falciformes. Mais ainda, pretende-se avaliar qual a região mais informativa (V1-V2 ou V3-V4) do gene 16S para o estudo da composição do microbioma intestinal.

Materiais e métodos: O procedimento baseou-se na análise de amostras de material fecal recolhidas antes e depois da administração de hidroxiureia em 16 crianças com anemia das células falciformes. Posteriormente estas amostras foram sequenciadas no equipamento Illumina NextSeq 550 pela técnica de Next Generation Sequencing, aplicando primers para amplificação das regiões pretendidas (com o total 64 amostras, 32 para cada região). Os resultados foram analisados com recurso ao software *STAMP* e *SPSS*. Estas amostras foram também analisadas quanto à presença da bactéria *Clostridium difficile*, identificada no decorrer da sequenciação.

Resultados: Os resultados permitiram observar um aumento de frequência de bactérias benéficas no microbioma intestinal após o tratamento, entre elas *Blautia luti* e *Ruminococcus callidus*. Verificou-se que os índices de alfa diversidade diminuíram ligeiramente após seis meses de administração de hidroxiureia e que a região V3-V4 mostrou ser a mais informativa.

Conclusão: Os resultados demonstram que a terapêutica com hidroxiureia altera o microbioma intestinal, promovendo a frequência de espécies benéficas. Esta técnica revela-se importante para o estudo do microbioma uma vez que é um método mais rápido permitindo compreender com maior precisão a sua composição microbiana.

Palavras-chave: Hemoglobina S, Anemia das células falciformes, Hidroxiureia, Microbioma intestinal, Gene 16S rRNA

Introduction: Sickle cell disease is a monogenic and hereditary blood disorder characterized by the existence of haemoglobin S, the most prevalent mutant haemoglobin variant worldwide. Sickle cell anaemia results in a homozygosity of haemoglobin S, contributing with numerous clinical complications and affecting the integrity of the intestinal microbiome, which plays a fundamental role in the pathophysiology of the disease. Hydroxyurea has been indicated as a potential modulator of sickle cell anaemia characteristics and may induce beneficial effects on the intestinal microbiome.

Objectives: Analyse the effects of hydroxyurea therapy on the composition of the intestinal microbiome in patients with sickle cell anaemia. Moreover, it is intended to evaluate which is the most informative region (V1-V2 or V3-V4) of the 16S gene for the study of the gut microbiome composition.

Materials and methods: The procedure was based on the analysis of samples of faecal material collected before and after hydroxyurea administration in 16 children with sickle cell anaemia. Subsequently, these samples were sequenced in the equipment Illumina NextSeq 550 by the technique Next Generation Sequencing, by applying primers for amplification of the desired regions (with a total of 64 samples, 32 for each region), and then the results were processed using the STAMP and SPSS software. These samples were also analysed for the presence of the bacterium *Clostridium difficile*, identified during sequencing process.

Results: The results allowed to observe an increase in the frequency of beneficial bacteria in the intestinal microbiome after treatment, among them *Blautia luti* and *Ruminococcus callidus*. Alpha diversity indexes decreased slightly after six months of hydroxyurea administration and that the V3-V4 region proved to be the most informative.

Conclusion: The results show that hydroxyurea therapy changes the intestinal microbiome, promoting the frequency of beneficial species. This technique is important for the study of the microbiome as it is a faster method allowing a more precise understanding of the microbial composition.

Keywords: Haemoglobin S, Sickle cell anaemia, Hydroxyurea, Gut microbiome, 16S rRNA gene

Agradecimentos.....	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice.....	vi
Índice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Capítulo 1- Introdução	1
1.1. Hemoglobina humana.....	1
1.2. Hemoglobinopatias	2
1.3. Doença das células falciformes	4
1.4. Adesão celular e neutrófilos.....	7
1.5. Opções de terapêutica.....	8
1.5.1. Transfusões sanguíneas e transplantes de células estaminais.....	8
1.5.2. Hidroxiureia e novas terapêuticas.....	9
1.6. Estudo do microbioma intestinal	10
2. Capítulo 2 – Objetivos.....	12
2.1. Objetivos gerais do projeto	12
2.1.1. Objetivos específicos	12
3. Capítulo 3 - Materiais e Métodos	13
3.1. Dimensão da população em estudo.....	13
3.2. Obtenção das amostras.....	13
3.3. Extração e quantificação de DNA	13
3.4. PCR do polimorfismo RS334	14
3.5. PCR e sequenciação 16S rRNA para as regiões V1-V2 e V3-V4	14
3.6. PCR para deteção de bactérias do género <i>Clostridium</i>	15
3.7. PCR para deteção de bactérias da espécie <i>Clostridium difficile</i>	17

3.8. Análise estatística.....	18
4. Capítulo 4 – Resultados.....	19
4.1. Análise da alfa- diversidade.....	19
4.2. Comparação do microbioma antes e depois da Hidroxiureia com recurso à análise das regiões V3-V4 e V1-V2 do gene 16S rRNA	25
4.2.1. Comparação do microbioma em diferentes regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA	29
4.3. Detecção da espécie <i>Clostridium difficile</i>	33
5. Capítulo 5 – Discussão dos resultados	34
6. Capítulo 6 – Conclusões.....	40
6.1. Conclusões.....	40
6.2. Perspetivas futuras	42
7. Capítulo 7 – Referências Bibliográficas.....	43
Anexos.....	50
1: Protocolo para PCR RS334 e digestão RFLP	50
2: Procedimento para realização de eletroforese	51
3: PCR do polimorfismo RS334	52

Índice de Figuras

Figura 1 - A) Representação do desenvolvimento humano antes e após o nascimento e expressão das cadeias da globina; B) Constituição dos loci;	2
Figura 2 - Representação das possíveis formas de hemoglobinopatias.....	3
Figura 3 - Demonstração da distribuição dos possíveis genótipos de doença falciforme na descendência.....	5
Figura 4 - Índice de alfa-diversidade correspondente a riqueza de espécies ACE analisando ambas as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, com um teste estatístico de Mann-Whitney e um valor de significância de 0,05. (ns: não significativo e *: $p < 0,05$)	19
Figura 5 - Índice de alfa-diversidade correspondente a riqueza de espécies CHAO analisando ambas as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, aplicando um teste estatístico de Mann-Whitney com um nível de significância de 0,05. (ns: não significativo e *: $p < 0,05$)	20
Figura 6 - Índice de alfa-diversidade correspondente a riqueza de espécies Jackknife nas regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, aplicando um teste estatístico de Mann-Whitney com um nível de significância de 0,05. (ns: não significativo e *: $p < 0,05$).....	21
Figura 7 – Número de OTU's presentes nas regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, aplicando o teste estatístico de Mann-Whitney com um valor p estatístico de 0,05. (ns: não significativo e * $p < 0,05$)	21
Figura 8 - Comparação do índice de alfa diversidade Shannon para as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos correspondentes a pré e após seis meses de HU, aplicando um teste estatístico de Mann-Whitney considerando um valor de significância de 0,05. (ns: não significativo)	22
Figura 9 – Índice de alfa diversidade NPS Shannon comparando as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós HU, considerando um teste estatístico de Man-Whitney e aplicando um valor p de 0,05. (ns: não significativo).....	22
Figura 10 - Índice de alfa-diversidade Simpson nas regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, recorrendo a um teste estatístico de Mann-Whitney com um nível de significância de 0,05. (ns: não significativo)	23
Figura 11 - Índice de alfa-diversidade relativo ao índice de Phylogenetic Diversity utilizando as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, aplicando um teste estatístico de Mann-Whitney a um nível de significância de 0,05. (ns: não significativo e * $p < 0,05$)	24
Figura 12 - Resultados obtidos para o índice de alfa-diversidade Good's coverage library com comparações para ambas as regiões analisadas aplicando o teste estatístico de Mann-Whitney assumindo um valor p estatístico de 0,05. (ns: não significativo, *: $p < 0,05$)	24

Figura 13 - Grupos taxonômicos, Filo, Classe e Ordem com diferenças estatisticamente significativas registadas na região V3-V4 pré e pós a introdução de HU como terapêutica, aplicando um teste “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança de 95%. A - Filo; B - Classe; C Ordem;	26
Figura 14 - Bactérias ao nível da taxonomia Família estatisticamente significativas observadas para a região V3-V4 no período antes e 6 meses após a administração de hidroxíureia com um teste estatístico “Welch’s t-test” e intervalo de confiança a 95%.....	26
Figura 15 - Taxonomia Gêneros bacterianos com diferenças estatisticamente significativas registadas nas regiões V3-V4 nos períodos antes e depois da administração de HU com um teste “Welch’s t-test” a um intervalo de confiança de 95%.	27
Figura 16 - Taxonomia Espécies bacterianas que registaram diferenças estatisticamente significativas registadas nas regiões V3-V4 e V1-V2 nos períodos antes e depois da administração de HU. A - Espécies bacterianas estatisticamente significativas para a região V3-V4; B – Espécies bacterianas estatisticamente significativas para a região V1-V2. Análise com um teste “Welch’s t-test” a um intervalo de confiança de 95%.	28
Figura 17 - Comparação dos resultados obtidos durante o período anterior ao tratamento com HU nas regiões V1-V2 e V3-V4 para um teste “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%. (A) - Taxonomia filo; (B) - Taxonomia classe;	29
Figura 18 - Comparação dos resultados obtidos durante o período anterior ao tratamento com HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4 do gene 16S rRNA para a taxonomia Gênero com um teste “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.....	30
Figura 19 - Comparação dos resultados obtidos durante o período anterior ao tratamento com HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4 para a taxonomia Espécies, com o teste estatístico “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.	31
Figura 20 – Filo visualizado no período de seis meses após o início do tratamento com HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4, para um teste “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.	31
Figura 21 - Comparação dos resultados obtidos para a taxonomia Gênero durante o período de seis meses após o início do tratamento com HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4, com o teste estatístico “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.	32
Figura 22 - Comparação dos resultados registados para a taxonomia Espécies durante o período pós HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4, com uma análise estatística de “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.	32
Figura 23 - Amplificação observada no canal FAM que deteta a toxina B	33
Figura 24 - Amplificação registada no canal VIC que deteta a toxina A.....	33
Figura 25 - PCR do polimorfismo RS334 para a classificação das amostras 23F, 23FI, 132F, 132FI e 115F	52

Figura 26 - PCR do polimorfismo RS334 para a caracterização das amostras AF115, Unk1, Unk2 e Unk3 53

Lista de Abreviaturas

ACE – Estimador de cobertura baseado na abundância

AGCC – Ácidos gordos de cadeia curta

AF – Anemia Falciforme

BCAM – *Basal cell molecule in human* (Molécula de adesão celular basal)

B. luti – *Blautia luti*

CHAO – Estimador baseado no número de espécies raras numa amostra

C.difficile – *Clostridium difficile*

CD36 – Glicoproteína plaquetária 4

DII – Doença inflamatória intestinal

DF – Doença Falciforme

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EMA – *European Medicine Agency* (Agência Europeia do Medicamento)

ESTeSL – Escola Superior de Tecnologia e Saúde de Lisboa

F/B – relação *Firmicutes/Bacteroidetes*

FDA – *Food and Drug Administration* (Administração de alimentos e medicamentos)

F. prausnitzii – *Faecalibacterium prausnitzii*

Hb – Hemoglobina humana

HbA – Hemoglobina do adulto

HbC – Hemoglobina C

HbE – Hemoglobina E

HbF – Hemoglobina fetal

HbS – Hemoglobina S

HBB – Subunidade beta da hemoglobina

HLA – *Human leukocyte antigen* (Antigénio leucocitário humano)

HU – Hidroxiureia

H₂O – Água

H&TRC – Health and Technology Research Center (Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia)

ISEL – Instituto Superior de Engenharia de Lisboa

IPL – Instituto Politécnico de Lisboa

LCR – *Locus control region* (Região de controlo do locus)

Lu – Luterano

MO – Medula Óssea

NGS – *Next generation sequencing* (Sequenciação de nova geração)

O₂ – Oxigénio

OMS – Organização Mundial de Saúde

OTU – *Operational taxonomic unit* (Unidade taxonómica operacional)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

q-PCR – PCR em tempo real

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossómico

RSB – Tampão de ressuspensão

R. albus – *Ruminococcus albus*

R. bromii – *Ruminococcus bromii*

R. callidus – *Ruminococcus callidus*

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

STAMP – *statistical analysis of taxonomic and functional profiles* (análise estatística de perfis taxonómicos e funcionais)

VCAM – *Vascular cell adhesion molecule* (Molécula de adesão celular vascular)

% – Percentagem

μl – Microlitro

ml – Mililitro

g – Gramas

°C – Grau Celsius

ng – Nanogramas

1. Capítulo 1- Introdução

1.1. Hemoglobina humana

A hemoglobina (Hb) representa um pigmento vermelho e proteico do sangue, que se encontra presente nos eritrócitos, originados em células da medula óssea, e é conhecida como uma molécula responsável pelo transporte de oxigénio formando, com este, uma ligação instável e reversível^[1]. Aquando da circulação arterial, a molécula de Hb apresenta uma elevada afinidade para o oxigénio (O₂) possibilitando o seu transporte para os tecidos. Já na circulação venosa, as afinidades são invertidas^[2,3]. A Hb é descrita como um tetrâmero de proteína constituído por quatro subunidades, com um complexo proteico e um complexo de ferro, em que cada unidade é composta por uma cadeia de polipeptídeos e por um grupo Heme. Cada subunidade da Hb encontra-se ligada a um grupo Heme, composto por uma molécula de ferro II (Fe²⁺) e por protoporfirinas, unidos por uma ligação covalente, permitindo o transporte de quatro moléculas de O₂^[1]. A hemoglobina do adulto (HbA) apresenta uma estrutura quaternária e é composta por dois tipos diferentes de cadeias da globina, a cadeia α (alfa) com 141 aminoácidos e a cadeia β (beta) com 146 aminoácidos, que são semelhantes em número de resíduos de aminoácidos^[1,2].

Ao longo da vida, a Hb é expressa de formas distintas, variando entre hemoglobina embrionária (HbZ), hemoglobina fetal (HbF) e por fim hemoglobina do adulto (HbA), conforme a fase de desenvolvimento humano^[1]. A expressão em cada fase da hemoglobina é regulada de forma distinta de modo a satisfazer as necessidades em oxigénio durante o desenvolvimento, ocorrendo o fenómeno de comutação/mudança da hemoglobina (hemoglobina *switch*). Em qualquer uma das fases da Hb, a sua estrutura é idêntica, apresentando quatro subunidades, duas cadeias α -globina e duas β -globina, cujos loci representam os genes que são ativados e silenciados de forma sequencial durante o crescimento e estão localizados nos cromossomas 16 e 11. Deste modo, cada loci encontra-se diretamente relacionado com a síntese de globinas e ambos contém genes distintos (Figura 1)^[2]. O locus α da globina, presente no cromossoma 16 contém os genes HBZ (ζ), o gene HBA1 (α 1) e o gene HBA2 (α 2), sendo o gene HBZ expresso durante o início do desenvolvimento embrionário e silenciado aquando do primeiro trimestre de gestação para dar lugar à expressão dos genes HBA1 e HBA2 que persistem até à idade adulta. Por sua vez, no locus β do cromossoma 11 a comutação da hemoglobina apresenta uma maior complexidade. O locus da β -globina contém cinco genes distintos, o gene HBE1 (ϵ), o gene HBG2 (γ G), o gene HBG1 (γ A), o gene HBD (δ) e o gene HBB (β), ocorrendo a regulação de um modo diferente^[4]. Aquando do primeiro trimestre de gestação é expresso o gene HBE, que corresponde à Hb embrionária, emparelhando-se posteriormente com os genes ζ (HBZ) e α da globina originando as formas de hemoglobina embrionária funcional. Com o silenciamento da expressão do gene HBE, os genes HBG1 e HBG2

são expressos, formando a principal forma de hemoglobina durante a fase gestacional, hemoglobina fetal (HbF)^[5]. A HbF é a forma predominante de hemoglobina que se encontra presente no feto durante o período de gestação e produzida aproximadamente até aos seis meses de vida por células precursoras de eritrócitos^[6]. Esta é composta de duas subunidades alfa e duas gama estando os genes que expressam proteínas presentes na cadeia beta do cromossoma 11^[5]. Posteriormente, algumas semanas após o nascimento a HbF é silenciada, passando os genes HBD e HBB a serem expressos, unindo-se para formar a HbA, a forma principal expressa na idade adulta. Na extremidade do locus β -globina no cromossoma 11 encontra-se localizado o LCR (*Locus control region*) que controla toda a região do locus ^[4,7].

O LCR encontra-se a montante do locus do cromossoma 11 e é descrito como uma região dinâmica que atua na transcrição das globinas e que possui capacidades que melhoram a expressão dos genes. De uma forma geral, o LCR funciona como regulador e melhorador, pois compete com os genes da β -globina determinando as fases de desenvolvimento específicas em que cada gene será expresso^[8,9].

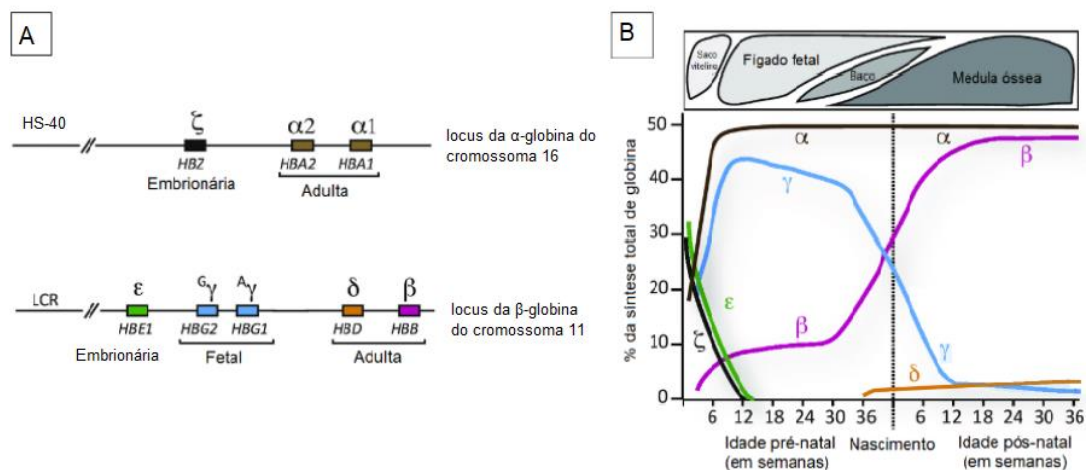


Figura 1 - A) Representação do desenvolvimento humano antes e após o nascimento e expressão das cadeias da globina; B) Constituição dos loci; Adaptado de: [5]

1.2. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias englobam o grupo de desordens sanguíneas mais comuns em todo o mundo com uma prevalência de 5% a 7% da população mundial segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS)^[10,11]. Vários estudos apontam que, por ano, as hemoglobinopatias - doença falciforme (DF) e síndromes de talassemia - afetem aproximadamente cerca de 300.000 recém-nascidos a nível mundial e que, mais de 80% dos nascimentos ocorram em países com médios ou poucos recursos^[12]. Alguns estudos sugerem ainda que as hemoglobinopatias foram inicialmente identificadas em regiões tropicais, onde a malária é endêmica, como em África e

também no Médio oriente^[12]. No entanto, devido ao crescimento da imigração, as hemoglobinopatias têm vindo a disseminar-se e atualmente estão presentes também na Europa e na América ^[11,13].

Assim, o termo “hemoglobinopatias” engloba todas as desordens monogénéticas e hereditárias que afetam a Hb – DF e talassemias - resultando de falhas quantitativas, quer a nível estrutural quer ao nível da síntese das suas cadeias polipeptídicas^[10,12].

As hemoglobinopatias podem ser divididas em dois grandes grupos (Figura 2), consoante as mutações ou deleções ocorridas nos genes das cadeias α ou β -globina. Assim, caso as mutações ou deleções ocorram ao nível da síntese das cadeias da Hb sem afetarem a estrutura, alterando a produção da proteína, a hemoglobinopatia designa-se síndrome de talassemia, α ou β , conforme a cadeia afetada. Nas síndromes de talassemia ocorre a diminuição da síntese de determinada cadeia da Hb, conduzindo a um desequilíbrio ou produção excessiva de uma das cadeias, diminuindo deste modo a capacidade de sobrevivência dos eritrócitos afetados ^[13].

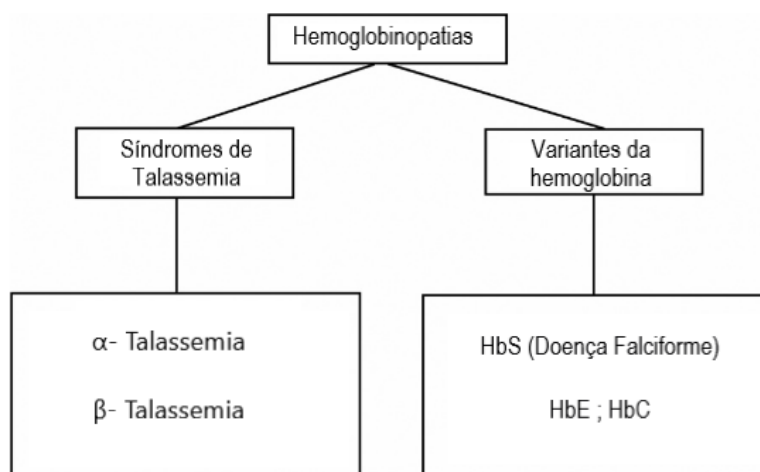


Figura 2 - Representação das possíveis formas de hemoglobinopatias. Adaptado de [14]

Contrariamente às síndromes de talassemia, quando estas mutações ou deleções ocorrem a nível estrutural, levando à produção de proteínas anormais, verifica-se a produção de variantes mutantes como a hemoglobina S (HbS), que origina a DF ou ainda, outras variantes estruturais como hemoglobina E (HbE) e hemoglobina C (HbC) ^[13,14]. A gravidade de expressão da hemoglobinopatia depende também de fatores genéticos como a capacidade de produção de hemoglobina fetal (HbF) que, em determinados casos, níveis elevados podem ser benéficos^[13,14]. Avaliando todas as mutações que dão origem às hemoglobinopatias é possível notar que a mutação mais patogénica é a que dá origem a anemia das células falciformes devido à presença de HbS que, ao formar

polímeros, contribui para a estrutura de foice apresentada pelo eritrócito. Na presença única de HbS, os eritrócitos afetados apresentam uma elevada tendência para obstruir os vasos sanguíneos reduzindo o fornecimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos adjacentes, resultando em consequências negativas para a saúde dos indivíduos^[11,15].

1.3. Doença das células falciformes

A hemoglobina S (HbS) é a variante mutante mais conhecida (e prevalente a nível mundial) da Hb, podendo ser identificada em indivíduos portadores de doença falciforme (DF)^[16,17]. À semelhança da Hb, a HbS é descrita pela literatura como um tetrâmero originada por uma única mutação no gene HBB, que é responsável por determinar a estrutura das cadeias polipeptídicas da Hb^[17,18]. Esta surgiu nos humanos há milhares de anos representando a variante mais conhecida e patogénica da Hb^[19]. No entanto, são descritas ainda outras variantes da Hb como a hemoglobina C (HbC) que, ao serem combinadas com a HbS manifestam diferentes implicações clínicas^[2,20].

Desta forma, a hemoglobina S resulta de uma mutação pontual (missense) ocorrida no gene HBB da cadeia β -globina da hemoglobina. Esta mutação leva a uma substituição de aminoácidos no sexto codão do gene, passando a encontrar-se valina ao invés de ácido glutâmico na referida posição (**β Glu6Val**)^[2,21]. Desta substituição, resulta um ganho de hidrofobicidade (uma vez que surge um aminoácido hidrofóbico (valina) na posição de um hidrofílico (ácido glutâmico)). O ganho de hidrofobicidade, resulta na formação de polímeros de HbS que, em situação de hipoxia, ao polimerizarem irão destabilizar a membrana do eritrócito, originando a sua forma de foice^[1,21]. Deste modo, a HbS apresentará uma maior carga positiva quando comparada com a Hb^[17,19]. A HbS, quando desoxigenada (anormal) pode ser encontrada sob a forma polarizada nos eritrócitos aumentando a sua rigidez, fazendo com que, conseqüentemente alterem a sua forma passando a apresentar um formato de foice e aderindo mais facilmente as paredes dos vasos sanguíneos, obstruindo-os^[18,22].

A DF, descrita inicialmente em 1910, pertence ao grupo das hemoglobinopatias mais prevalentes a nível mundial^[19,23]. Esta hemoglobinopatia representa um conjunto de desordens sanguíneas hereditárias, de carácter recessivo resultantes da presença de mutações na cadeia da Hb que levam ao aparecimento de variantes como a hemoglobina S^[19,21]. Assim, a DF é caracterizada pelo surgimento de eritrócitos mutantes (falciformes) devido à mutação S que afeta sobretudo a função da Hb ^[24,25].

A DF é considerada uma doença multi-sistémica (que afeta múltiplos órgãos do organismo humano) e que se encontra associada a uma elevada morbidade bem como uma redução da esperança média de vida, devido às manifestações clínicas que apresenta e que, podem ser bastante heterogéneas ^[23,26]. É mais prevalente em zonas endémicas de malária, mas também em países como a Arábia Saudita e Índia^[24,26]. Alguns estudos relatam que atualmente no continente africano aproximadamente 200.000 recém-nascidos são afetados, por ano, com alguma variante de DF, onde a mortalidade é elevada, podendo atingir os 90% em crianças até aos cinco anos de idade, devido à indisponibilidade de rastreios pré-natais^[19,24,25].

Sendo a DF uma doença de carácter hereditário, a disseminação de genótipos na descendência varia conforme os o genótipo dos progenitores^[13,14]. Isto significa que, na presença de ambos os progenitores portadores da variante HbS, manifestando apenas traço falciforme e, portanto, heterozigóticos, existe 50% de probabilidade de a descendência ser portadora da mutação S (heterozigóticos ou com traço falciforme), 25% de ocorrência de indivíduos saudáveis (AA), com dois alelos de Hb, e outros 25% de a descendência expressar o genótipo SS, homozigótico para a hemoglobina S, designado como anemia das células falciformes (Figura 3)^[22,25].

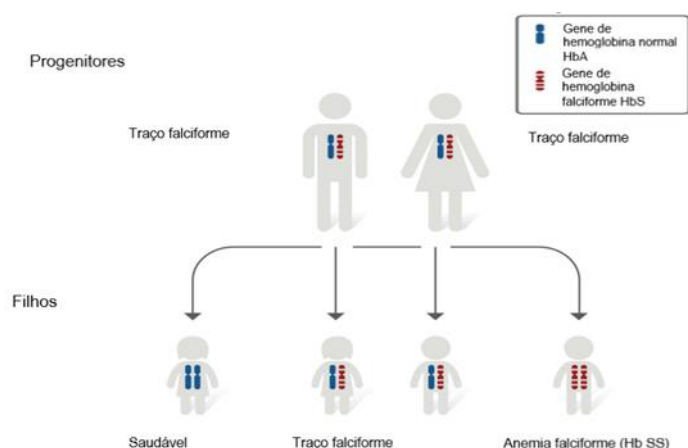


Figura 3 - Demonstração da distribuição dos possíveis genótipos de doença falciforme na descendência. Adaptado de [36]

A Anemia das células falciformes (AF) resulta da herança do genótipo SS de doença falciforme representando um atual problema de saúde pública principalmente na África-Subsaariana onde se estima que, por ano, mais de 300.000 novos nascimentos sejam afetados com esta condição^[27,28]. Devido às dificuldades de acesso a rastreios de recém-nascidos e cuidados básicos de saúde, sobretudo em países subdesenvolvidos (onde a prevalência é elevada) a mortalidade verificada em crianças com menos de cinco anos de idade continua alta, ao contrário de países onde os programas de rastreio estão devidamente implementados^[27,29]. A nível mundial, a AF apresenta uma maior prevalência no continente africano onde a sua incidência pode atingir 1,5% em Angola, com cerca de 10.000 nascimentos registados por ano e 80% dos nascimentos registados nas regiões que compõem a África Subsaariana^[30,31]. A severidade da DF encontra-se associada à quantidade de HbF circulante (em adultos saudáveis representa menos de 1%) e, sendo a HbF um importante inibidor de hemoglobina S, pode proporcionar grandes benefícios clínicos ^[32,33].

A HbF representa o principal modulador de características genéticas e clínicas da doença falciforme (DF) sendo os seus genes geneticamente regulados e o nível de eritrócitos falciformes altamente variável, consoante do nível de expressão destes genes^[5,34]. Os níveis aumentados de HbF encontram-se associados a manifestações menos graves da doença devido ao seu efeito na diminuição da polimerização da HbS^[35].

Embora o estado heterozigótico (traço) de doença falciforme (AS) não se encontre normalmente associado a episódios clínicos, esta doença encontra-se associada a diversas complicações clínicas. O seu diagnóstico é inicialmente baseado na quantificação de hemoglobina S e da variante adicional, caso exista, através de um teste de hemoglobina, antes ou após o nascimento^[22,25].

A AF é caracterizada pelas suas manifestações clínicas nomeadamente a vaso-oclusão (causada pelo bloqueio dos vasos sanguíneos pelos eritrócitos), que origina as crises de dor, e pela anemia hemolítica crónica e autoimune^[22,36]. As suas manifestações clínicas podem variar de agudas ou crónicas e, resultam maioritariamente da desoxigenação da HbS que, ao polimerizar-se no interior das células, perturba os eritrócitos, danificando-os, resultando assim na oclusão dos vasos e, posteriormente em anemia hemolítica (caracterizada pela destruição anormal dos eritrócitos)^[22,37]. As crises agudas vaso-oclusivas (ou crises falciformes) resultam principalmente da estimulação de fibras nervosas decorrente da obstrução da circulação por parte dos eritrócitos falciformes, bem como da interação destes eritrócitos falciformes com neutrófilos envelhecidos^[11,38]. Ao se ligarem às células epiteliais, os eritrócitos irão contribuir para a limitação da circulação sanguínea e de oxigénio para os órgãos adjacentes levando a uma hipoxia tecidual de alguns órgãos, podendo causar anemia ^[22,38,39].

Pacientes com anemia falciforme são frequentemente alvo de hospitalizações repetitivas devido a consequências das crises falciformes pelo que, são suscetíveis a infeções nosocomiais bacterianas (adquiridas em ambiente hospitalar), nomeadamente por *pneumococos* que, associado às frequentes crises no baço e às síndromes torácicas agudas (ou enfartes, devido à hipoxia tecidual) podem revelar-se fatais para estes indivíduos^[21,37].

A distribuição geográfica dos genótipos de DF é bastante variável. A nível mundial é estimado que a prevalência de DF continue a aumentar tanto em países subdesenvolvidos como desenvolvidos devendo-se este facto ao constante aumento de imigração que contribui para a sua disseminação^[22,25].

1.4. Adesão celular e neutrófilos

Os neutrófilos são células pertencentes ao sistema imunitário que, possuem um papel protetor do organismo contra processos infecciosos^[40,41]. No entanto, estes também possuem um papel importante nas crises vaso-oclusivas uma vez que se ligam aos eritrócitos falciformes, contribuindo para a oclusão dos vasos^[40]. As crises falciformes estão maioritariamente associadas a contagens de neutrófilos elevadas pelo que, quanto maior a contagem destas células em circulação maior o número de eritrócitos falciformes que se pode ligar facilitando a ligação a células epiteliais, proporcionando a ocorrência de crises falciformes^[40,42].

A ligação entre os eritrócitos falciformes e as células epiteliais representa um processo complexo e que é mediado através de interações entre as moléculas de adesão celular e a célula epitelial, formando ligações entre si permitindo a adesão dos eritrócitos. Os eritrócitos falciformes bem como os reticulócitos (eritrócitos imaturos) expressam, na superfície da sua membrana, níveis aumentados de moléculas de adesão celular, nomeadamente Lu/BCAM (luterano/ molécula de adesão celular basal), que promove interações entre células e entre célula e matriz extracelular, e CD36, que é um recetor glicoproteico e medeia as interações das células com o endotélio^[43,44]. Estas moléculas são altamente relevantes na fisiopatologia da doença falciforme. A sua expressão aumentada implica a aderência destas células à molécula de adesão celular VCAM (molécula de adesão celular vascular), que é expressa pelas células endoteliais ativadas, permitindo a ligação à célula epitelial e contribuindo para a formação das crises vaso-oclusivas^[44,45].

1.5. Opções de terapêutica

No âmbito da doença falciforme, os eritrócitos afetados pela hemoglobina S têm o seu aspeto e estrutura alterados devido à polimerização da sua hemoglobina^[37]. Embora apresentem diferentes origens, as hemoglobinopatias possuem formas semelhantes de terapêutica^[46]. No entanto, os recursos apresentados para a terapêutica da DF são bastante limitados ou até mesmo escassos em países pouco desenvolvidos e com recursos baixos onde, as hemoglobinopatias tendem a apresentar uma frequência mais elevada^[46,47]. Entre as principais formas de tratamento para a DF inclui-se o fármaco hidroxiureia (HU), outros medicamentos com substâncias ativas como *Voxelotor* e *Crizanlizumab*^[48], L-glutamina e ainda transfusões sanguíneas e transplantes de células estaminais hematopoiéticas, com o objetivo de mitigar o efeito negativo das crises falciformes a fim de, aumentar a qualidade de vida^[37,46].

1.5.1. Transfusões sanguíneas e transplantes de células estaminais

A terapia com transfusões sanguíneas continua a ser a terapêutica base para o tratamento da DF devido à eficácia que apresentam^[21,49]. Globalmente estima-se que cerca de 90% dos indivíduos com alguma forma de hemoglobinopatia recebam pelo menos uma transfusão ao longo da sua vida. O princípio de atuação destas transfusões consiste na introdução de eritrócitos saudáveis (de indivíduos compatíveis) na corrente sanguínea dos pacientes afetados com DF fazendo com que, sendo a concentração de eritrócitos normais superior à de eritrócitos falciformes, ocorra uma diminuição de eritrócitos com HbS em circulação, verificando-se melhorias ao nível do transporte de oxigénio para os restantes órgãos^[32]. Esta introdução de eritrócitos saudáveis na corrente sanguínea de pacientes com DF irá contribuir para a prevenção a longo prazo de danos nos órgãos causados pelas crises falciformes. No entanto, e apesar das suas vantagens, esta forma de terapêutica acarreta algumas complicações nomeadamente reações hemolíticas devido à formação de anticorpos através de aloimunização (exposição de anticorpos a um antígeno desconhecido, aumentando o risco de reações pós-transfusionais) de diferenças de compatibilidade^[21,49,50]. Relativamente a estas complicações pode ainda ocorrer a possibilidade de transferência de outras infeções bem como a indução de elevados níveis de ferro prejudiciais para a saúde^[49,50].

Embora as transfusões sanguíneas sejam consideradas terapêuticas base para a anemia falciforme, os transplantes de células estaminais hematopoiéticas continuam a prevalecer como terapias modeladoras e com potencial 100% curativo na maioria dos casos de doença falciforme^[49]. Estes têm por base a indução de células estaminais ou células-tronco (originárias do cordão umbilical ou da medula óssea) com HLA (*human leukocyte antigen*) compatível entre irmãos com o objetivo de substituir todas as células hematopoiéticas, inibindo a eritropoiese indevida, auxiliando assim a medula óssea na produção de novos eritrócitos saudáveis^[21,51]. Com esta substituição de

células hematopoiéticas, dá-se a substituição de eritrócitos falciformes fazendo com que haja uma prevenção e diminuição de eventos vaso-oclusivos bem como de outros eventos cerebrovasculares^[32,50]. No entanto esta técnica compõe uma terapêutica muito limitada devido aos elevados custos ou indisponibilidade de doadores compatíveis (doadores irmãos) podendo levar a aloimunizações, tal como as transfusões sanguíneas^[50-52]. Estes transplantes de células estaminais e transfusões sanguíneas, embora apresentem algumas complicações, podem contribuir para a diminuição da mortalidade associada à anemia falciforme (AF)^[28,48].

1.5.2. Hidroxiureia e novas terapêuticas

As complicações apresentadas pela anemia falciforme surgem logo após o nascimento, principalmente quando se verifica o decaimento da HbF (que constitui o principal inibidor da polimerização da Hb evitando a formação de HbS) torna-se cada vez mais necessário provocar o seu aumento através de terapêuticas farmacológicas como a hidroxiureia^[47,50]. Deste modo, torna-se essencial a disseminação deste tipo de terapêuticas (que contribuem com a indução farmacológica de HbF) em regiões subdesenvolvidas onde as hemoglobinopatias apresentam uma maior prevalência^[46].

A hidroxiureia (ou hidroxycarbamida, HU) cuja fórmula química é dada por $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$, aprovada em 1998 pela FDA (*Food and Drug Administration*) e em 2007 pela EMA (*European Medicine Agency*)^[4] constitui uma das terapêuticas farmacológicas (via oral), aprovadas para o tratamento e modelação da doença falciforme e compõe um fármaco citotóxico e antimetabólico^[21,47]. É amplamente utilizada no tratamento de inúmeras patologias, entre elas: leucemias e outros câncros, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (ou SIDA causada pelo vírus da imunodeficiência humana, VIH) e ainda a anemia falciforme^[46,47]. Este, é um fármaco de eficácia promissora provocando o aumento de níveis de HbF evitando a formação de eritrócitos falciformes, diminuindo também a frequência de ocorrência de crises vaso-oclusivas^[49,53]. Além disto, a administração de HU contribui ainda para a redução de contagens de neutrófilos (importantes na fisiopatologia de crises vaso-oclusivas), para a diminuição de marcadores pró-inflamatórios e ainda com a diminuição da adesão e ativação de leucócitos^[49,50]. Assim, a HU colabora para a diminuição da requisição de transfusões sanguíneas, a redução da hemólise dos eritrócitos falciformes e das crises vaso-oclusivas (ou crises de dor)^[47,54]. O êxito clínico da terapêutica com HU para a modelação da doença falciforme foi clinicamente comprovado em crianças e adultos, nomeadamente pelos efeitos benéficos como a diminuição das crises vaso-oclusivas, o que proporciona uma redução da taxa de hospitalizações e mortalidade (associada principalmente a crises de dor e a danos em órgãos como o baço, cérebro e rins, resultantes de constantes hipoxias)^[46,47].

As recentes terapêuticas para o tratamento da AF recorrem a agentes farmacológicos cujo objetivo é o de recuperar e melhorar o efeito negativo causado pela polimerização da HbS^[52]. Deste modo, existem outros fármacos, L-glutamina, *Oxbryta* e *Adakveo*, designados medicamentos órfãos (por ser usado em condições raras de saúde) que atuam em conjunto (ou não) com a hidroxureia, cujos objetivos são os de contribuir para o aumento da formação de hemoglobina fetal. Entre eles incluem-se fármacos como *Oxbryta*, aprovado em 2019 pela FDA, cuja molécula ativa será o *Voxelotor* cuja função é a de se ligar à molécula de Hb inibindo a sua polimerização. Já o fármaco *Adakveo*, aprovado também em 2019, cuja sua substância ativa é um anticorpo monoclonal (a *Crizanlizumab*) que se irá ligar a molécula de p-seletina (que permite a adesão dos eritrócitos aos vasos sanguíneos, contribuindo para o seu bloqueio) de forma a bloquear a sua ação, auxiliando assim na prevenção das crises vaso-oclusivas^[46]. Por sua vez a administração de L-glutamina, um suplemento anti-inflamatório, obteve aprovação pela FDA devido ao seu potencial redutor de eritrócitos falciformes diminuindo assim a incidência de crises vaso-oclusivas e consequentes hospitalizações de indivíduos com anemia falciforme^[41].

1.6. Estudo do microbioma intestinal

O conjunto de microrganismos (bactérias, fungos e vírus) que colonizam o intestino constitui a microbiota intestinal que, é responsável pela manutenção da homeostase do organismo, regulação metabólica, pela resposta imunitária e ainda pela regulação da contagem de neutrófilos envelhecidos^[55]. Ao conjunto dos genes expressos pela microbiota designa-se de microbioma intestinal^[37]. O microbioma intestinal representa o microbioma mais importante no organismo humano tornando-se bastante relevante na manutenção da integridade intestinal, da homeostase e na regulação tanto da imunidade como do bom funcionamento do organismo^[42,56]. Este é, na sua maioria, composto por uma vasta comunidade bacteriana, fungos, protozoários e outros microrganismos eucariotas responsáveis pela manutenção do metabolismo e atuam como elementos reguladores nos processos inflamatórios e infecciosos^[37,57]. A microbiota intestinal é maioritariamente colonizada por dois grandes filos – *Bacteroidetes*, que engloba as bactérias Gram-negativas, e *Firmicutes*, correspondente às bactérias Gram-positivas onde se inclui o género *Clostridium*. Em indivíduos adultos saudáveis são ainda encontrados os filos bacterianos – *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e ainda *Verrucomicrobia* ^[58].

Um estudo realizado em pré-adolescentes com o objetivo de caracterizar o microbioma intestinal de indivíduos em idade pediátrica, concluiu que a microbiota de crianças saudáveis é complexa e maioritariamente dominada por dois grandes filos - *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. No entanto, sendo o microbioma dinâmico, a relação verificada entre estes filos torna-se mais abundante à medida que o indivíduo atinge a idade adulta (onde é enriquecido com *Bacteroides*)^[59,60].

O intestino humano encontra-se repleto de microrganismos essenciais para a manutenção do metabolismo e têm sido considerados fontes potenciais de novas terapêuticas para processos inflamatórios^[40,56]. No entanto, a composição e diversidade de espécies microbianas presentes na microbiota é muitas vezes afetada devido a fatores externos (ambientais, utilização de antibióticos, fatores genéticos e processos inflamatórios) causando, na maioria das vezes, uma desregulação da diversidade^[37,56]. Estas alterações provocadas a nível da composição e diversidade microbianas resultam principalmente numa desregulação da imunidade o que torna o organismo suscetível a infeções. Deste modo, a manutenção do microbioma é de extrema importância para impedir o desenvolvimento de bactérias e microrganismos patogénicos. A perda de diversidade (disbiose) poderá estar na base do crescimento e colonização por parte de bactérias patogénicas e produtoras de toxinas como *Clostridium difficile*, bactéria gram-positiva, responsável por causar diarreias infecciosas^[42,61]. A colonização do intestino por parte destas bactérias pode ser combatida através de bactérias comensais responsáveis pela promoção de células epiteliais capazes de impedir o crescimento de agentes patógenos promotores de processos inflamatórios e infecciosos^[40,56]. Assim, o microbioma intestinal poderá ser implicado do desenvolvimento de algumas doenças^[58,62]. Deste modo, torna-se importante a sua caracterização e análise, através de técnicas de metagenómica que envolvem a sequenciação do gene 16S rRNA obtido através de amostras biológicas, de forma a compreender a sua implicação em processos de homeostase e patogénese de doenças ^[37,57].

Em indivíduos com DF, algumas bactérias que compõem o microbioma intestinal podem ter uma ação prejudicial quanto à suscetibilidade a infeções, nomeadamente nosocomiais (adquiridas em ambiente hospitalar)^[37]. Estas infeções bem como outros processos inflamatórios tornam-se responsáveis por alterações significativas na composição do microbioma que, no âmbito da DF, poderá ser essencial na resposta à regulação da contagem de neutrófilos envelhecidos e do número de crises vaso-oclusivas^[41,42].

A disbiose intestinal, frequentemente observada em indivíduos com DF poderá estar associada ao aumento da contagem destes neutrófilos envelhecidos em circulação^[42,62]. Esta contribui principalmente para aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, que é mantida pela junção de duas membranas, anatômica e fisiológica, que regulam a passagem de iões e outras macromoléculas e formam a primeira barreira de defesa contra invasões de agentes patogénicos^[31,63]. Quando se verifica a interrupção da barreira intestinal ocorre a translocação de bactérias patogénicas e não patogénicas para a circulação, o que pode causar inflamações na mucosa^[63,64]. Fármacos como a hidroxureia possuem um efeito benéfico, não só na regulação e redução de contagens de neutrófilos envelhecidos (que contribuem para as crises vaso-oclusivas), mas também para a redução desta disbiose intestinal, muito associada à doença falciforme. A regulação da disbiose poderá contribuir para a manutenção da permeabilidade da barreira intestinal e regulação da deslocação de bactérias patogénicas para a circulação^[31,64].

2. Capítulo 2 – Objetivos

2.1. Objetivos gerais do projeto

O principal objetivo deste projeto será a avaliação e estudo da influência do tratamento com o fármaco Hidroxiureia (HU), no microbioma intestinal de doentes com anemia das células falciformes, comparando os períodos antes e após seis meses do início da terapêutica.

2.1.1. Objetivos específicos

- 1) Avaliação da influência da HU no microbioma intestinal.
- 2) Compreender e identificar qual a região mais informativa do gene 16S rRNA, V1-V2 ou V3-V4, para o estudo do microbioma intestinal na anemia das células falciformes; verificar se o tratamento com hidroxiureia contribui para o aumento ou diminuição dos índices de alfa-diversidade.

3. Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Neste capítulo serão descritos os procedimentos utilizados nas várias fases do estudo. Iniciando pela seleção e dimensão da população em estudo, passando pela obtenção das amostras e finalmente serão descritos os vários procedimentos utilizados nas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase), bem como da sequenciação para posterior análise do microbioma intestinal dos pacientes, antes e após o tratamento com Hidroxiureia (HU).

3.1. Dimensão da população em estudo

A dimensão da população deste estudo será um total de 16 crianças com anemia das células falciformes. Neste estudo, as crianças foram avaliadas relativamente à evolução do microbioma intestinal antes e após seis meses do tratamento com o fármaco hidroxiureia, bem como relativamente à evolução dos seus dados clínicos durante o intervalo de tratamento.

3.2. Obtenção das amostras

Para a análise do microbioma intestinal foram recolhidas 32 amostras de fezes dos períodos pré e pós HU de 16 crianças angolanas, recorrendo a um protocolo específico que assegura a segurança na colheita e transporte das amostras, recorrendo a tubos de colheita específicos, *DNA/RNA Shield Fecal Collection Tube* do kit *Zymo Research*, que apresentam uma solução que permite inativar/conservar as amostras sem necessidade de refrigeração. Deste modo, as amostras foram armazenadas a temperatura ambiente e transportadas até ao destino final, de modo a não alterar a composição do microbioma.

3.3. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo “*ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research)*”^[65]. Posteriormente, o DNA extraído foi quantificado, recorrendo ao NanoDrop One® (ThermoFisher), que realiza a quantificação da concentração de DNA presente na amostra e informa sobre a razão de absorvância da mesma, que serve para avaliar a qualidade de DNA extraído. Posteriormente o DNA extraído foi armazenado num congelador a uma temperatura de 20°C.

3.4. PCR do polimorfismo RS334

Após a conservação, à temperatura de -20°C, foram realizados alguns PCR convencionais do polimorfismo RS334 em gel de agarose, de modo a confirmar que as crianças em estudo eram de genótipo SS. O PCR do polimorfismo RS334 para a determinação do genótipo foi realizado recorrendo a primers para amplificação da região de interesse. O reagente utilizado foi *MIX platinum HSII* sendo adicionado juntamente com os primers perfazendo a mix pretendida, constituída pela enzima, DNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados) e primers. De seguida, as amostras com o produto PCR resultante, com um volume total de 25µl, foram colocadas num termociclador CFX96 da Biorad® recorrendo às condições do programa descrito: desnaturação a 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos e 68°C durante 15 segundos e por fim, uma fase de extensão de 4°C. Após a reação de PCR foi realizada a digestão RFLP das amostras obtidas, adicionando a estas, o tampão *CutSmart buffer*, a enzima BSU36I e também H₂O em que, as quantidades destes reagentes variam conforme o número de amostras utilizado, deixando incubar a uma temperatura de 37°C durante 60 minutos. Finalmente, para a determinação do genótipo, foi realizado um gel de agarose a 2% com 100 ml de TBE (*buffer*) e adicionando 5µl de *red safe*, 2µl de *loading buffer*, 5µl de *ladder* e 8µl do produto PCR e digestão.

3.5. PCR e sequenciação 16S rRNA para as regiões V1-V2 e V3-V4

Após a quantificação, as amostras obtidas de DNA das fezes foram diluídas, com recurso a uma solução tampão de ressuspensão Tris com pH 8,5 e para uma concentração de 5ng/µl.

Foi realizado um PCR, com recurso a primers, *forward* e *reverse* respetivamente, para amplificação da região V3 e V4 do gene 16S rRNA que será uma das regiões de interesse: primer 16S V3-V4 F (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 3')

e primer 16SV3-V4 R

(5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC3').

Juntamente com os primers *forward* e *reverse* foi também adicionado o reagente KAPA HiFi HotStart ReadyMix e, de seguida, as amostras foram inseridas no termociclador CFX96 Biorad de acordo com o seguinte programa: etapa de desnaturação de 95°C durante 3 minutos, etapa de *annealing* de 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e por fim uma etapa de extensão de 72°C por 5 minutos. Posteriormente, o produto resultante da reação PCR foi aplicado no equipamento TapeStation 4200, recorrendo a uma *flow cell*, a fim de, realizar a confirmação do tamanho dos fragmentos presentes em cada amostra.

De seguida realizou-se um PCR para preparação das bibliotecas genómicas recorrendo aos reagentes do kit *Nextera XT DNA Library Prep* (Illumina) e posteriormente estas bibliotecas, que incluem os fragmentos significativos, foram purificadas com o auxílio de esferas AMPure XP beads

(reagente), tampão de ressuspensão RSB e a uma placa magnética^[66,67]. A utilização da placa magnética juntamente com as AMPure XP beads e RSB permitem a ligação de fragmentos maiores presentes nas bibliotecas que posteriormente foram de novo verificadas em termos de tamanho, recorrendo ao equipamento TapeStation e quantificadas com recurso ao equipamento Qubit, para determinação da diluição necessária.

O mesmo procedimento foi realizado para a amplificação da região V1 e V2 do gene 16S rRNA que será outra região de interesse para a análise do microbioma. O PCR para a amplificação da região V1-V2 foi realizado recorrendo a primers, que amplificam esta região: primer 16S V1-V2 F (5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGMGTTYGATYMTGGCTCAG3') e primer 16S V1-V2 (5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTGCCTCCCGTAGGAGT3'). Destas reações resultaram 64 amostras (32 referentes ao período antes e seis meses após HU na região V3-V4 e 32 referentes ao mesmo período, no entanto referentes à região V1-V2).

Por fim, os produtos resultantes tanto da região V1-V2 como da região V3-V4 e as bibliotecas genómicas foram sequenciados recorrendo ao equipamento NextSeq 550 da Illumina®. Finalmente, foram obtidos os ficheiros FASTQ resultantes que serão analisados recorrendo aos softwares bioinformáticos EZBioCloud e STAMP a fim de, serem identificados os principais grupos de taxonomias presentes e calculados os índices de alfa-diversidade.

3.6. PCR para deteção de bactérias do género *Clostridium*

Após a realização da sequenciação Next Generation Sequencing (NGS) às amostras dos períodos de antes e após o início do tratamento com HU, foi realizado PCR em tempo real (q-PCR) para a identificação da presença de bactérias do género *Clostridium*, que tinham sido anteriormente identificadas na sequenciação NGS. Este PCR foi realizado devido à identificação de diversas espécies de bactérias do género *Clostridium* ou *Clostridioides* em várias amostras. O género *Clostridium* é composto por aproximadamente cem espécies bacterianas que podem ser benéficas mas também patogénicas, responsáveis por vários processos inflamatórios e que podem ser relevantes para a doença falciforme ^[68]. Entre estes processos incluem-se o botulismo, causado pela elevada colonização de *Clostridium botulinum*, a gangrena gasosa, devido à presença de *Clostridium perfringens*, e ainda doenças diarreicas e colite pseudomembranosa que se devem à presença anormal da bactéria *Clostridium difficile* ^[69].

A realização do qPCR para a deteção de espécies do género *Clostridium/Clostridioides* teve por base o protocolo CloSpp dtec-qPCR do kit "Genetic PCR Solutions TM". Para a sua realização foram utilizados sete reagentes disponibilizados: TargetSpecies *dtec-qPCR-mix*, composto pela mistura de primers *forward* e *reverse* e pela sonda; a DNase/RNase *free water* (água); o controlo interno (*internal control qPCR-mix*) composto pela mistura entre os primers, sonda e o controlo interno; o

GPSTM-mix que representa uma *mastermix* composto pela enzima, dNTPs e *buffer*, e, por fim, os *standard template*, espécies alvo, e o *template buffer* para a ressuspensão do *standard template*.

O q-PCR foi realizado recorrendo a uma placa de PCR em tempo real. Inicialmente procedeu-se à formulação dos standards (C1-C5) para a curva de diluição, constituídos pelo reagente *standard template*, que foi reconstituído com 120 µl de *template buffer* e distribuídos 100 µl em cada tubo. Posteriormente procedeu-se à formulação da mix PCR composta pelo GPSTM-mix, pela TargetSpecies *dtec-qPCR-mix* e pela água, perfazendo um volume necessário para as reações contando com 5 standards e 1 controlo negativo, NTC. De seguida, a mix resultante foi distribuída por cada poço da placa (19 µl para cada amostra e 15 µl para cada standard) e posteriormente foi colocado 1 µl de DNA das amostras no respetivo poço. Para os standards a solução resultante foi distribuída 5 µl por cada poço (de C1 a C5) e para o controlo negativo foi adicionado 5 µl de DNase/RNase free water.

A placa resultante foi inserida no termociclador CFX96 da Biorad® sob o seguinte programa: uma etapa de ativação de 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 5 segundos e por fim uma fase de hibridação/extensão e coleção de dados de 60°C por 20 segundos. Finalmente, concluído a reação de PCR em tempo real, os dados foram visualizados sob dois canais de fluorescência: FAM, que amplifica de acordo com a presença de bactérias do gene *Clostridium*, e o canal HEX que funciona como controlo interno. Por fim, os dados foram analisados e elaborada a curva de diluição dos standards bem como calculada a eficiência da reação de q-PCR.

3.7. PCR para detecção de bactérias da espécie *Clostridium difficile*

Após a realização do q-PCR (CloSpp), para a detecção da presença de bactérias do género *Clostridium*, procedeu-se à realização de um novo q-PCR (BactoReal®) do “kit *clostridium difficile*”. A bactéria *C. Difficile* consiste numa bactéria gram-positiva, e anaeróbica e que normalmente está presente no trato gastrointestinal dos animais e seres humanos, fazendo parte da microbiota intestinal. A infeção causada pela bactéria é descrita como a causa principal de diarreia infecciosa nosocomial (adquirida em ambiente hospitalar) e de colite pseudomembranosa (inflamação intestinal grave). As estirpes patogénicas de *C. difficile* são responsáveis pela produção de múltiplas toxinas, entre elas toxina A que consiste numa enterotoxina e toxina B que é uma citotoxina responsáveis por doenças gastrointestinais, cujos genes serão detetados no PCR^[61].

O método utilizado pelo q-PCR baseia-se na detecção dos dois genes (*C. difficile* toxina A e *C. difficile* toxina B) nas 32 amostras de fezes utilizadas, sendo possível a diferenciação de toxinas através da curva de amplificação de PCR *multiplex* em tempo real. Estas toxinas são detetadas em simultâneo na reação pela utilização de dois canais (FAM e VIC) nos quais o canal FAM irá detetar a toxina A (*tcdA*) e o canal VIC irá detetar a toxina B (*tcdB*). Para a realização do PCR para a *C. difficile* recorreu-se à utilização de quatro reagentes disponibilizados: *C. difficile tcdA&B Assay mix*, constituído por *primers* e pela sonda (VIC+FAM) para a detecção das toxinas; o controlo positivo *C. difficile tcdA&B*, que representa o controlo positivo; a *DNA reaction mix* e a *nuclease free water*.

À semelhança do PCR CloSpp, o q-PCR foi realizado recorrendo a uma placa de 96 poços para a reação em tempo real. Inicialmente procedeu-se à formulação dos três controlos, sendo o controlo negativo composto apenas por 19µl de mix e 1µl de água (*nuclease free water*), o controlo positivo composto por 19µl de mix e 1µl da mistura entre 1µl do controlo positivo *C.difficile tcdA&B* com 4µl de água e, por fim o controlo positivo diluído composto por 19µl de mix e 1µl da diluição de 1µl do controlo positivo *C.difficile tcdA&B* e 10 µl de água. Posteriormente procedeu-se à formulação da *mix* constituída pelos reagentes *nuclease free water*, a *DNA reaction mix* e ainda a *C. difficile tcdA&B assay mix*, distribuída depois pelos poços com 1µl de DNA. A placa de q-PCR resultante foi colocada no termociclador CFX96 da Biorad® com base no seguinte programa: uma etapa de desnaturação de 50°C por 2 minutos, uma fase de *annealing* de 95°C por 20 segundos e uma fase de extensão e quantificação de 45 ciclos de 95°C durante 5 segundos e 60°C durante 1 minuto. Os dados obtidos foram visualizados através de ambos os canais e analisados^[70].

3.8. Análise estatística

Os resultados obtidos relativos ao microbioma intestinal das 64 amostras sequenciadas com recurso a sequenciação NGS foram introduzidos e comparados recorrendo à plataforma *EZBioCloud* e posteriormente trabalhados em gráficos através dos softwares ‘STAMP: *statistical analysis of taxonomic and functional profiles*’ versão 2.1.3 (2015) e IBM SPSS® versão 26 para os resultados de alfa diversidade. As diferenças registadas ao nível da composição do microbioma intestinal foram analisadas recorrendo ao teste estatístico ‘*Welch’s t-test*’ considerando um intervalo a 95% com valor $p=0,05$. Já os resultados para alfa-diversidade foram analisados recorrendo aos testes estatísticos de *Mann-Whitney* (análise de variância a um fator) e ao teste de *Kruskal-Wallis* (que analisa mais que dois grupos) ambos considerando um valor de significância estatística $p=0,05$.

Os gráficos do tipo *boxplot* obtidos para alfa-diversidade foram elaborados recorrendo ao software SPSS e trabalhados em Microsoft Excel 2016 e calculados os seguintes índices: ACE (estimador de cobertura baseado na abundância), calculado através de $(R = S_0 + a_0)$; sendo S_0 o número de taxa observado uma vez na amostra e a_0 o número de espécies desconhecidas mas não observadas), OTU's, CHAO (estimador baseado no número de espécies raras numa amostra), calculado através da expressão $S_{(\max)Chao} = S_{obs} + (a^2 + b^2)$, *Simpson*, *Shannon*, *NPS Shannon*, *Jackknife*, *Phylogenetic Diversity* e *Good’s coverage of library*, calculado por $(1 - F1/N)$ onde F1 representa o número de OTU e N representa a soma de abundâncias de OTU – considerando o teste de *Mann-Whitney* (não paramétrico e aplicado a duas amostras independentes) e o teste de *Kruskal-Wallis* aplicado a quatro grupos em simultâneo^[71].

4. Capítulo 4 – Resultados

4.1. Análise da alfa- diversidade

A análise da alfa-diversidade (que estima a riqueza e diversidade de espécies) presente no microbioma intestinal das 64 amostras sequenciadas – 32 amostras antes e depois do início do tratamento com HU visando a região V1-V2 e 32 amostras do mesmo período temporal, mas visando a região V3-V4 do gene 16S – foi realizada recorrendo aos softwares *EZBioCloud* e SPSS que consistem em ferramentas de bioinformática permitindo a comparação dos grupos taxonômicos presentes em determinadas amostras. Após a análise foram obtidos os resultados que se apresentam em seguida:

Para o índice de riqueza ACE, que estima a abundância de espécies baseando-se em estimadores, observam-se algumas diferenças. Pela figura 4 e para as sequências da região V3-V4, verifica-se uma diminuição do valor de abundância com a terapêutica de HU. Também em sequências da região V1-V2 é possível visualizar uma ligeira diminuição do valor médio no período após a terapêutica.

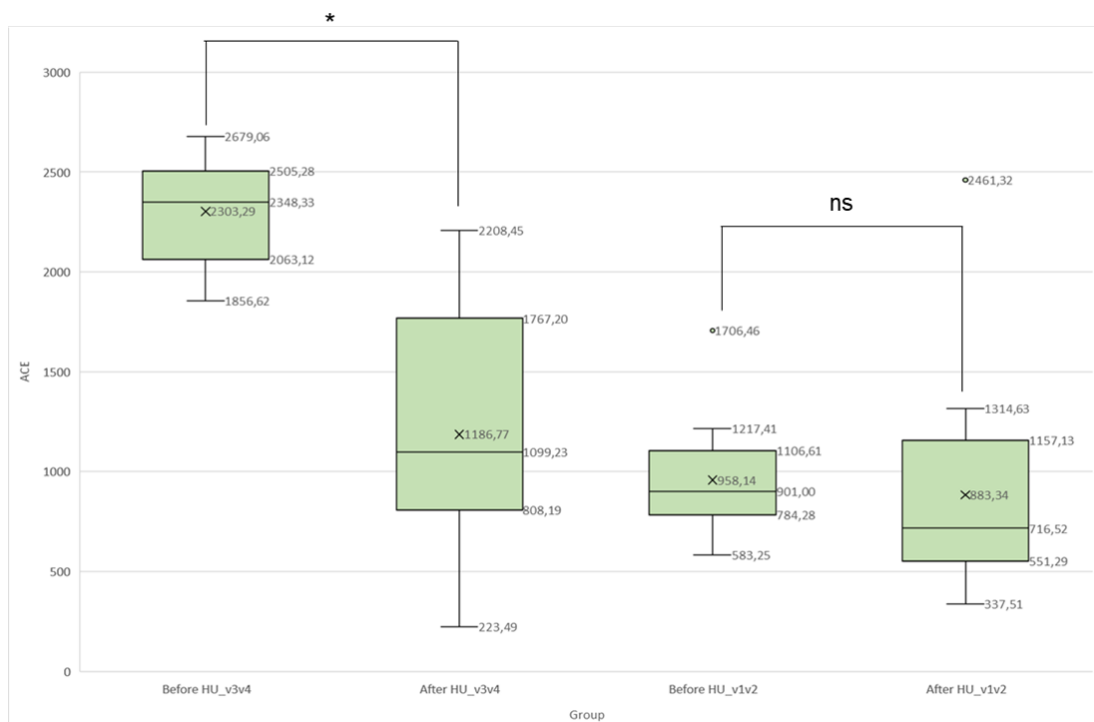


Figura 4 - Índice de alfa-diversidade correspondente a riqueza de espécies ACE analisando ambas as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, com um teste estatístico de *Mann-Whitney* e um valor de significância de 0,05. (ns: não significativo e *: $p < 0,05$)

Para o índice CHAO, que estima a riqueza de espécies baseando-se em contagens, é possível registrar algumas diferenças. À semelhança do índice ACE, em CHAO foi possível determinar que o maior valor de riqueza de espécies é registrado para o período antes de HU na região V3-V4, diminuindo no período de seis meses após o início da administração. Na região V1-V2 registou-se também uma ligeira diminuição deste índice com o tratamento (Figura 5).

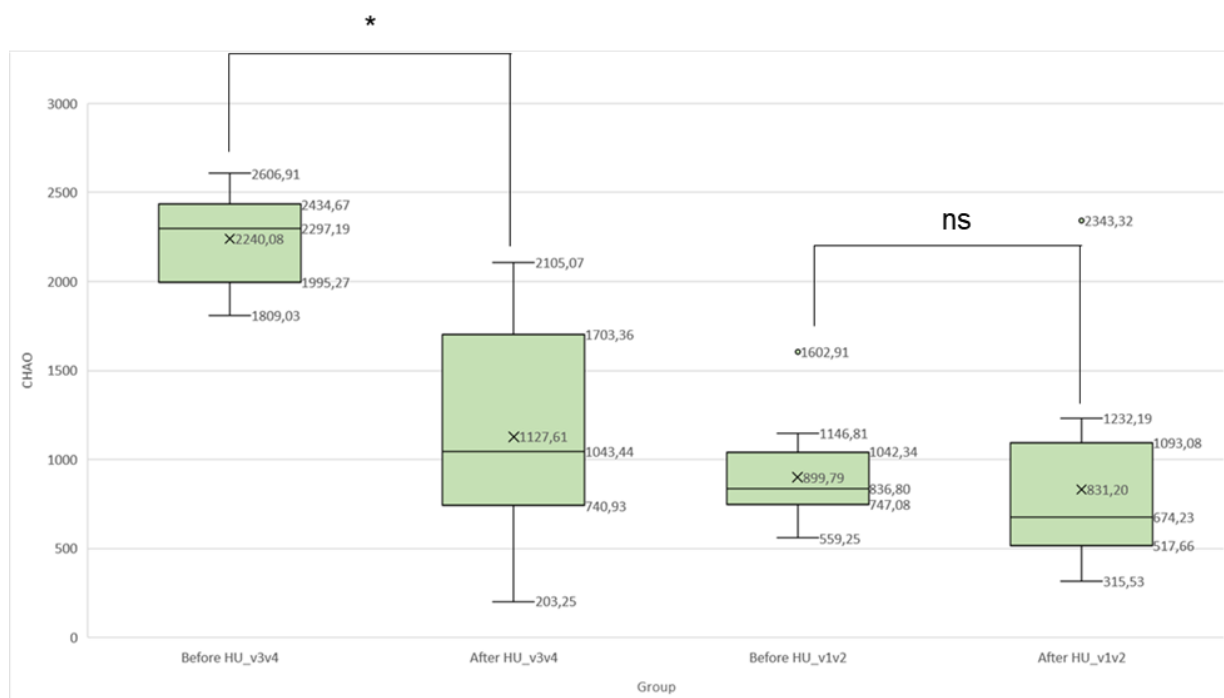


Figura 5 - Índice de alfa-diversidade correspondente a riqueza de espécies CHAO analisando ambas as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, aplicando um teste estatístico de *Mann-Whitney* com um nível de significância de 0,05. (ns: não significativo e *: $p < 0,05$)

Observando o índice *Jackknife*, que estima a riqueza de espécies presente numa determinada comunidade, e o número de OTU, que constitui a medida mais simples de alfa diversidade e que agrupa as bactérias nas suas respectivas unidades taxonómicas, verificam-se algumas diferenças como é possível observar na figura 6. À semelhança dos anteriores, o índice de riqueza *Jackknife* regista uma diminuição no período após HU para sequências da região V3-V4. O mesmo resultado é verificado para sequências das regiões V1-V2 após a terapêutica. De igual forma, para o índice mais simples de alfa-diversidade OTU, regista-se uma diminuição acentuada após hidroxiureia em sequências da região V3-V4, bem como uma diminuição após HU nas sequências da região V1-V2 tal como se observa na figura 7.

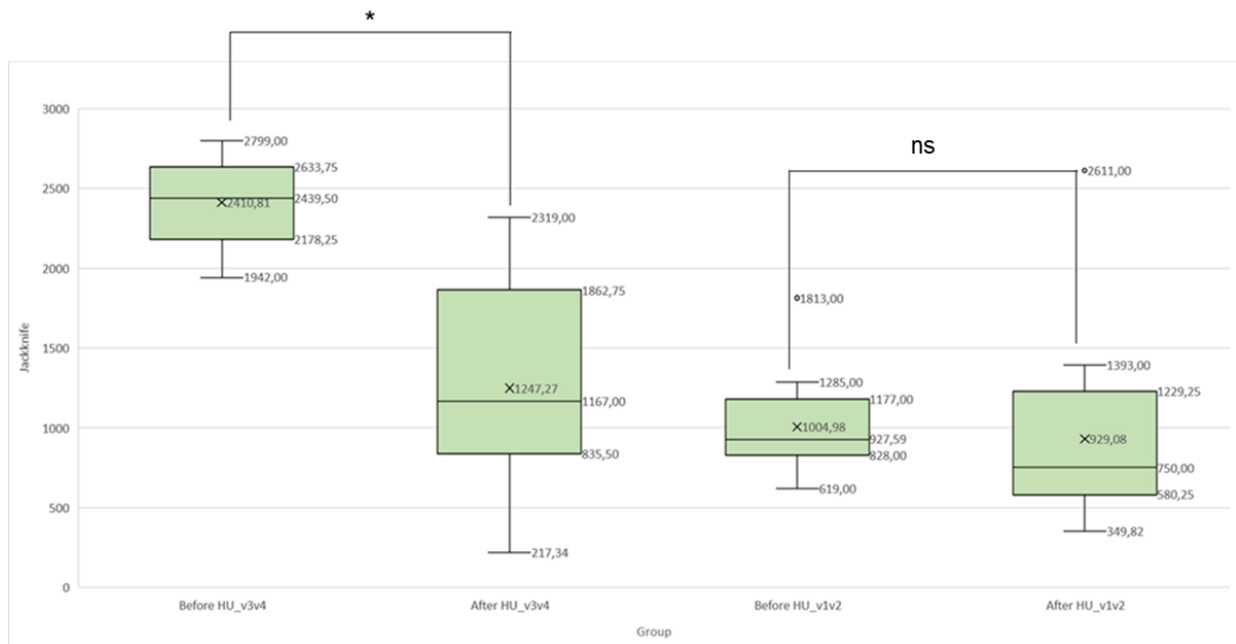


Figura 6 - Índice de alfa-diversidade correspondente a riqueza de espécies *Jackknife* nas regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, aplicando um teste estatístico de *Mann-Whitney* com um nível de significância de 0,05. (ns: não significativo e *: $p < 0,05$)

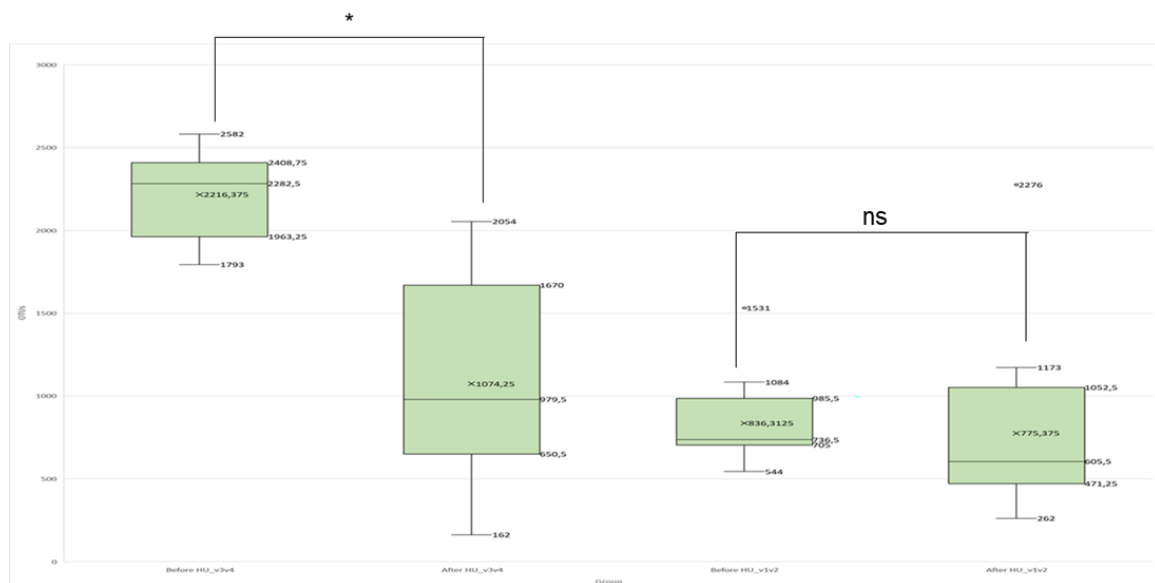


Figura 7 - Número de OTU's presentes nas regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, aplicando o teste estatístico de *Mann-Whitney* com um valor p estatístico de 0,05. (ns: não significativo e * $p < 0,05$)

Para estimar a diversidade de espécies, que consiste na abundância relativa da variedade de espécies bacterianas presentes numa determinada região, procedeu-se à análise estatística de quatro índices: índice *Simpson*, *Shannon*, *NPS Shannon* e *Phylogenetic diversity*. Para a maioria destes índices foram registadas diferenças (diminuição ou aumento) de valor médio. No entanto, para o índice *Shannon* (figura 8), que estima a diversidade de espécies bem como para o índice *NPS Shannon* (figura 9), que resulta de uma estimativa não paramétrica de *Shannon*, não são notados

aumentos nem diminuições significativas tanto em sequências da região V1-V2 como em sequências da região V3-V4. Assim, é possível afirmar que a administração de HU não contribui com variações significativas nestes índices.

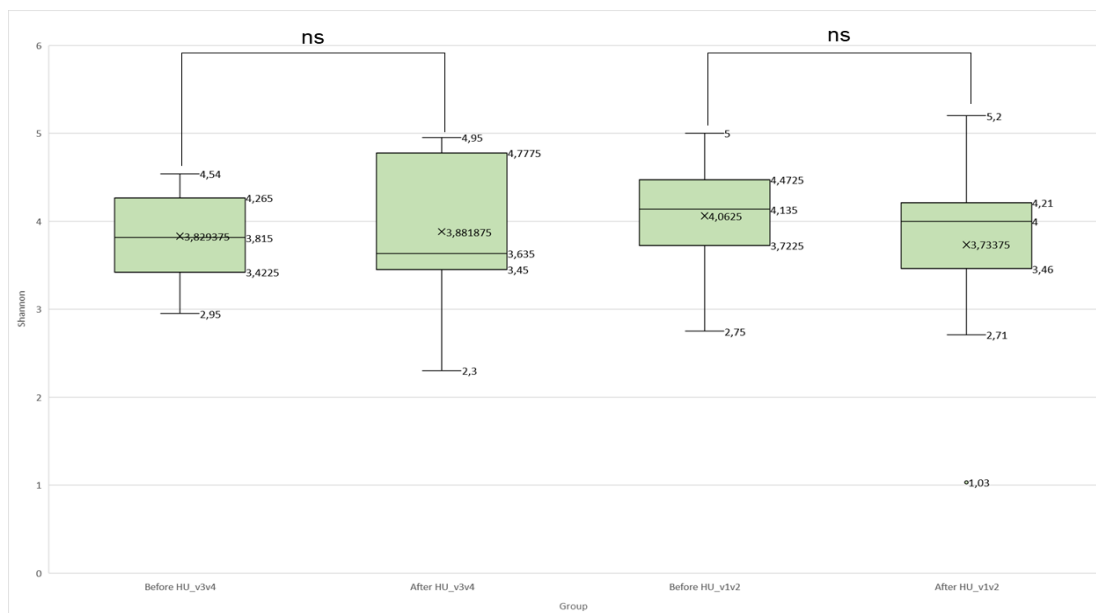


Figura 8- Comparação do índice de alfa diversidade *Shannon* para as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos correspondentes a pré e após seis meses de HU, aplicando um teste estatístico de *Mann-Whitney* considerando um valor de significância de 0,05. (ns: não significativo)

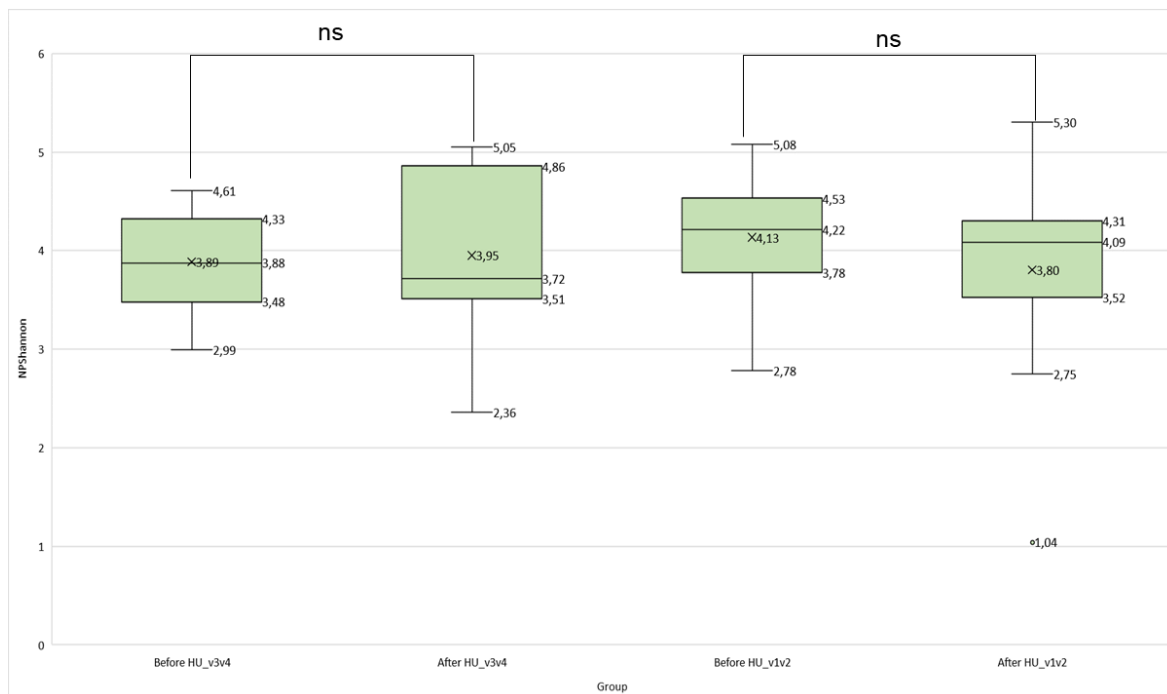


Figura 9 – Índice de alfa diversidade *NPS Shannon* comparando as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós HU, considerando um teste estatístico de *Man-Whitney* e aplicando um valor p de 0,05. (ns: não significativo)

Observando os restantes índices, Simpson (que mede o grau de concentração baseado na abundância de espécies dominantes) e *Phylogenetic Diversity* (medida de biodiversidade), verificam-se aumentos e diminuições conforme as sequências das regiões observadas. Para o índice de diversidade *Simpson* verifica-se que os valores mais elevados (valor médio=0,12) são registados em sequências da região V3-V4 no período antes do tratamento bem como em sequências da região V1-V2 após o tratamento, como mostra a figura 10. Observa-se assim, que a administração de HU não implica variações significativas para este índice.

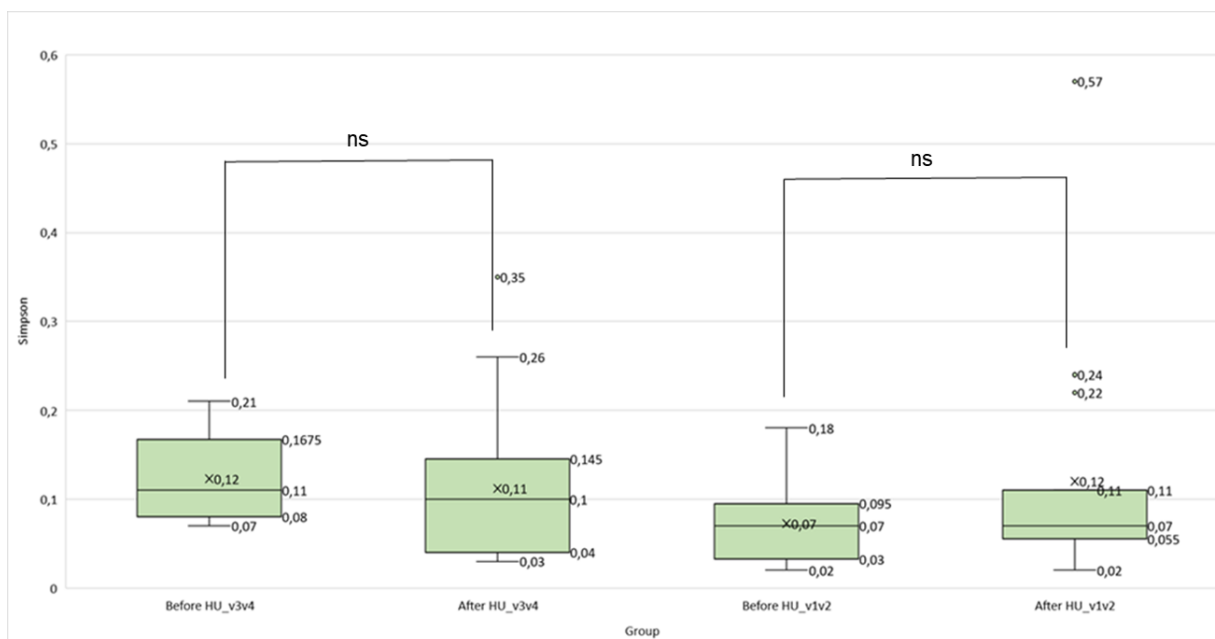


Figura 10 - Índice de alfa-diversidade *Simpson* nas regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, recorrendo a um teste estatístico de *Mann-Whitney* com um nível de significância de 0,05. (ns: não significativo)

Para o índice *Phylogenetic Diversity* foi possível determinar que o valor mais elevado é registado em sequências da região V3-V4 antes do início da terapêutica, registando uma diminuição no período pós-HU (Figura 11). No entanto, para sequências da região V1-V2 não são registadas alterações significativas com a terapêutica.

Por último, observando o índice *Good's coverage of library* (%) que constitui um importante estimador de alfa diversidade, verifica-se, à semelhança de *Phylogenetic diversity* um valor mais elevado no período pré-HU para sequências da região V3-V4, diminuindo posteriormente com o tratamento. O mesmo é possível constatar para sequências de regiões V1-V2 (Figura 12).

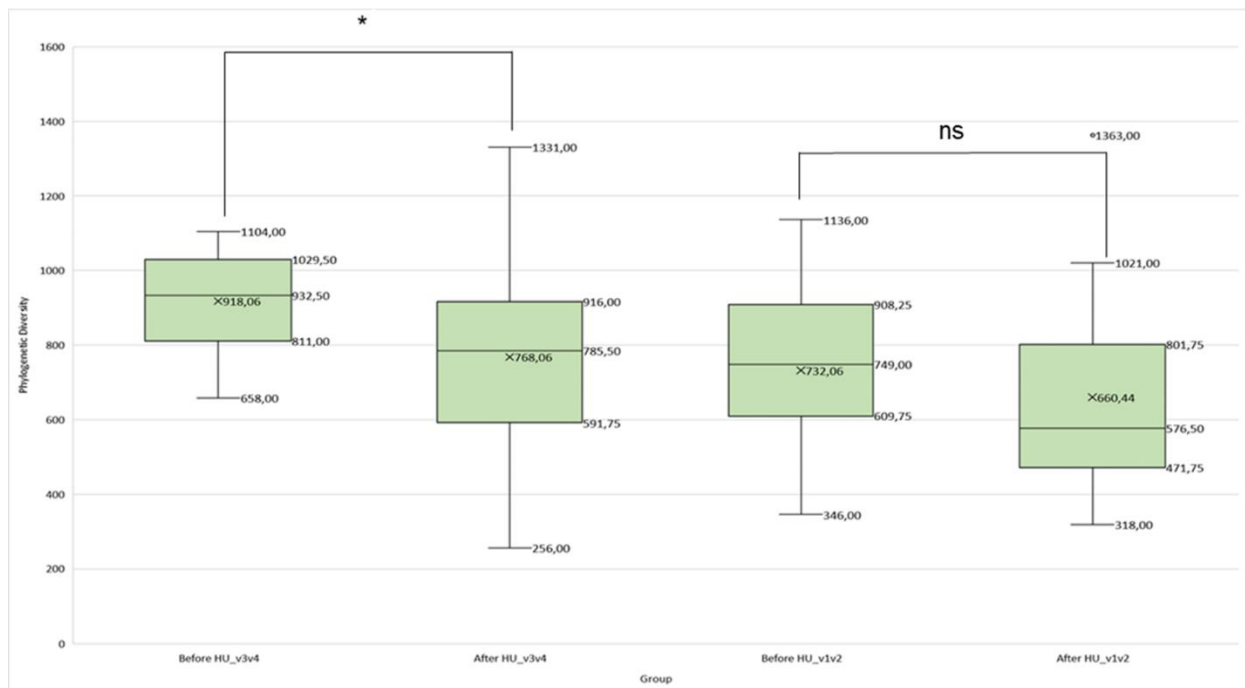


Figura 11 - Índice de alfa-diversidade relativo ao índice de *Phylogenetic Diversity* utilizando as regiões V1-V2 e V3-V4 nos períodos pré e pós hidroxiureia, aplicando um teste estatístico de *Mann-Whitney* a um nível de significância de 0,05. (ns: não significativo e * $p < 0,05$)

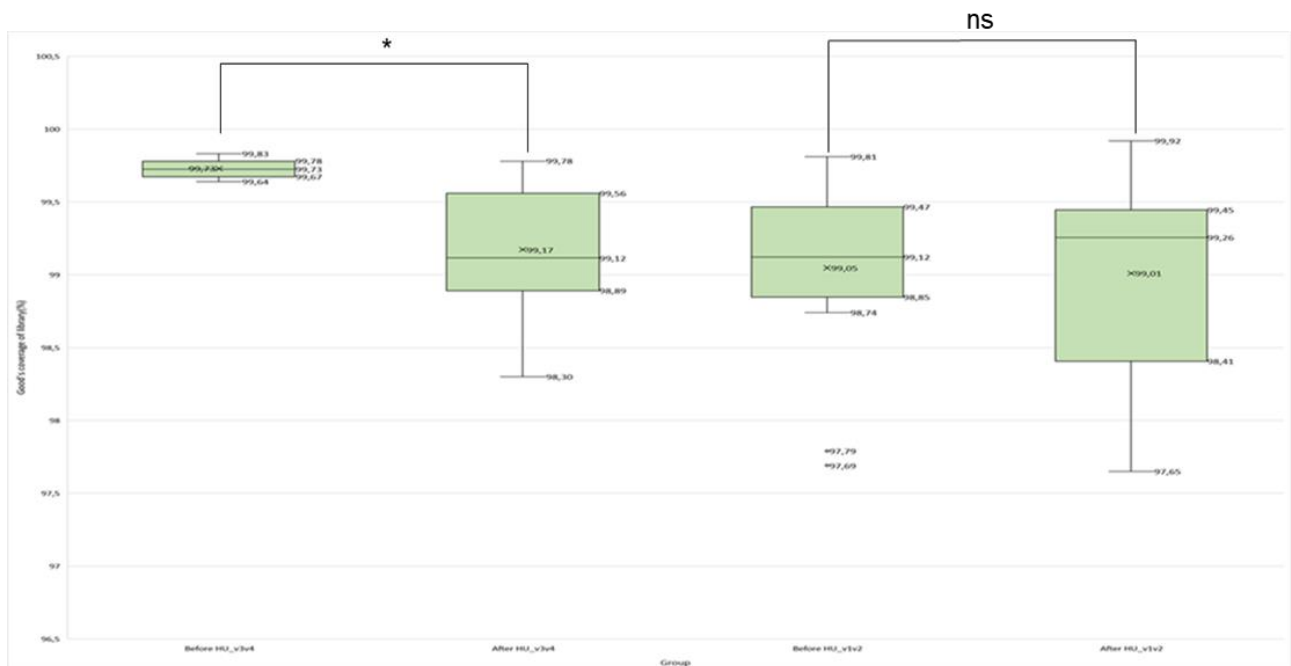


Figura 12 - Resultados obtidos para o índice de alfa-diversidade *Good's coverage library* com comparações para ambas as regiões analisadas aplicando o teste estatístico de *Mann-Whitney* assumindo um valor p estatístico de 0,05. (ns: não significativo, *: $p < 0,05$)

De um modo geral, é possível afirmar que o tratamento com hidroxiureia contribuiu para a diminuição da maioria dos índices de alfa-diversidade, analisando sequências de ambas as regiões V1-V2 e V3-V4 do gene 16S. Mais ainda, torna-se possível concluir que a região V3-V4 parece ser mais informativa que V1-V2 uma vez que, é nesta região (V3-V4) do gene que são observadas diferenças mais acentuadas.

4.2. Comparação do microbioma antes e depois da Hidroxiureia com recurso à análise das regiões V3-V4 e V1-V2 do gene 16S rRNA

A terapêutica recorrendo à hidroxiureia (HU) poderá atuar na composição e diversidade da microbiota intestinal sendo o objetivo ideal o de diminuir a prevalência de bactérias não benéficas e aumentar as bactérias “saudáveis” uma vez que, são as não benéficas que podem produzir um efeito negativo na fisiopatologia da anemia das células falciformes levando também à possível ocorrência de outras infeções ou fenómenos inflamatórios.

Analisando as sequências da região V3-V4 do referido gene, ao nível do filo é possível verificar que o filo *Firmicutes* é o único detetável nas sequências desta região (Figura 13-A), aumentando a sua frequência no período pós-HU ($p=0,049$). No entanto, nas sequências da região V1-V2, considerando o mesmo intervalo de tempo, não se mostrou informativa para estes grupos taxonómicos.

Descendo um nível de taxonomia, Classe, observando a figura 13-B para as sequências da região V3-V4 apenas a classe de bactérias gram-positivas *Betaproteobacteria*, pertencentes ao filo *Proteobacteria*, é detetável em sequências desta região, sendo a sua deteção superior em amostras após a administração de HU.

Para o grupo taxonómico Ordem, é possível aferir que, para sequências da região V3-V4 do gene 16S rRNA apenas é identificada a ordem *Burkholderiales* (figura 13-C), detetada em maior abundância no período pós-HU. No entanto, as sequências da região V1-V2 não se mostraram informativas para os grupos taxonómicos de filo, classe e ordem.

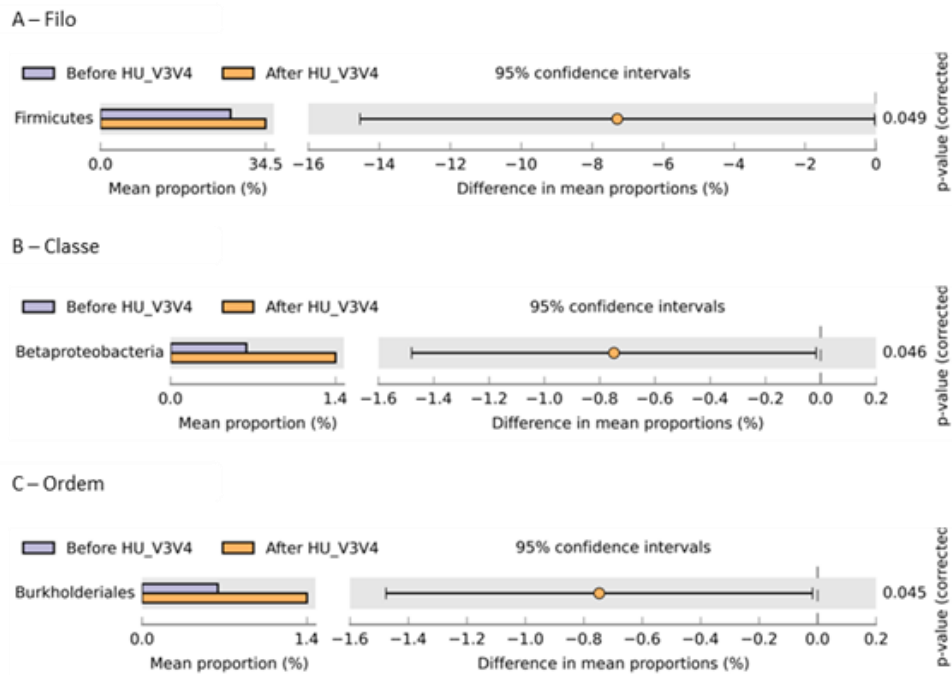


Figura 13 - Grupos taxonômicos, Filo, Classe e Ordem com diferenças estatisticamente significativas registradas na região V3-V4 pré e pós a introdução de HU como terapêutica, aplicando um teste “*Welch’s t-test*” com um intervalo de confiança de 95%. A - Filo; B - Classe; C Ordem;

Observando os grupos taxonômicos (família, gênero e espécie) é possível verificar que ao nível do grupo família são mais facilmente identificadas as famílias bacterianas *Victivallaceae* e *Sutterellaceae* (Figura 14). Verifica-se que ambas as famílias surgem com maior frequência no período de seis meses após HU nas sequências da região V3-V4 do gene 16S.

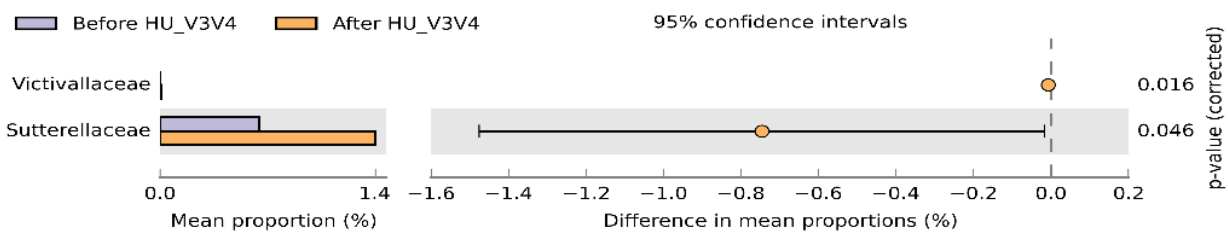


Figura 14 - Bactérias ao nível da taxonomia Família estatisticamente significativas observadas para a região V3-V4 no período antes e 6 meses após a administração de hidroxiureia com um teste estatístico “*Welch’s t-test*” e intervalo de confiança a 95%.

Ao nível do gênero (Figura 15), destacam-se dois gêneros bacterianos (*Ruminococcus* e *Agathobacter*) cujas diferenças são relevantes. Após seis meses da introdução de HU verifica-se uma maior frequência do gênero *Ruminococcus*. Já para o gênero *Agathobacter*, verifica-se que a terapêutica com HU conduziu a uma diminuição da sua abundância.

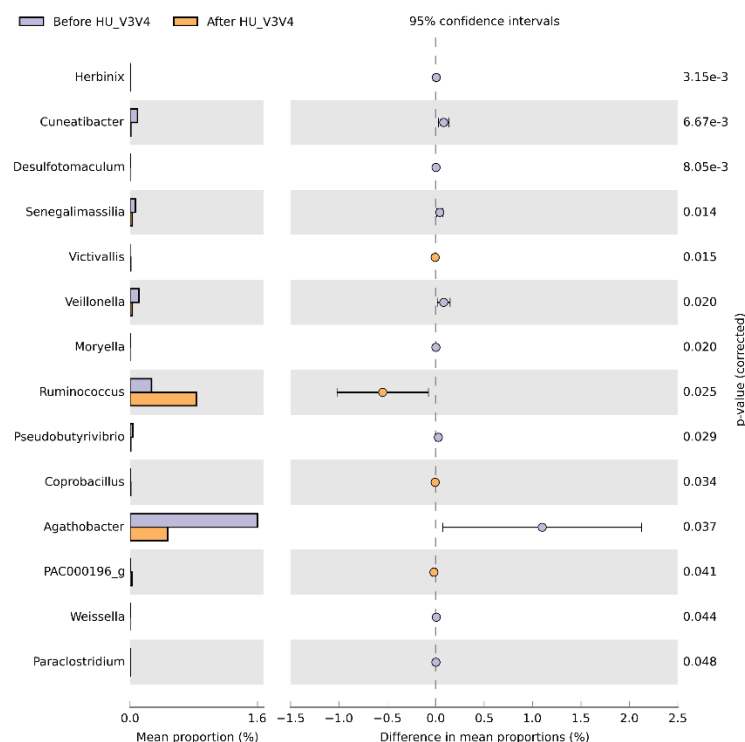


Figura 15 - Taxonomia Gêneros bacterianos com diferenças estatisticamente significativas registradas nas regiões V3-V4 nos períodos antes e depois da administração de HU com um teste “*Welch’s t-test*” a um intervalo de confiança de 95%.

Descendo ainda mais na classificação e observando a taxonomia referente a espécies verifica-se que apesar de todas as espécies representadas apresentarem diferenças significativas no período antes e após seis meses do início do tratamento, destacam-se quatro espécies bacterianas mais frequentes nas sequências da região V3-V4 (Figura 16-A). Das espécies mais relevantes três são mais frequentes em sequências da região V3-V4 no período após HU (entre elas *Ruminococcus callidus*, *Blautia luti group* e *Bifidobacterium gallinarum group*), enquanto a espécie *Senegalimassillia anaerobia* é mais abundante no período pré-HU. No entanto, observando a taxonomia espécies para o mesmo período, mas para a região V1-V2 é possível verificar a presença de apenas duas espécies com a alteração após HU, *Romboustsia lituseburenis* e *Eubacterium coprostanoligenes*, ambos pertencentes ao filo *Firmicutes*, sendo estas menos identificadas no período após HU (Figura 16-B).

De um modo geral, analisando o microbioma em sequências de diferentes regiões do gene 16S nos períodos antes e após a administração de HU, é possível verificar que sequências das regiões V3-V4 são mais informativas que V1-V2, ou seja, são capazes de detetar maior número de grupos taxonômicos bem como as suas alterações.

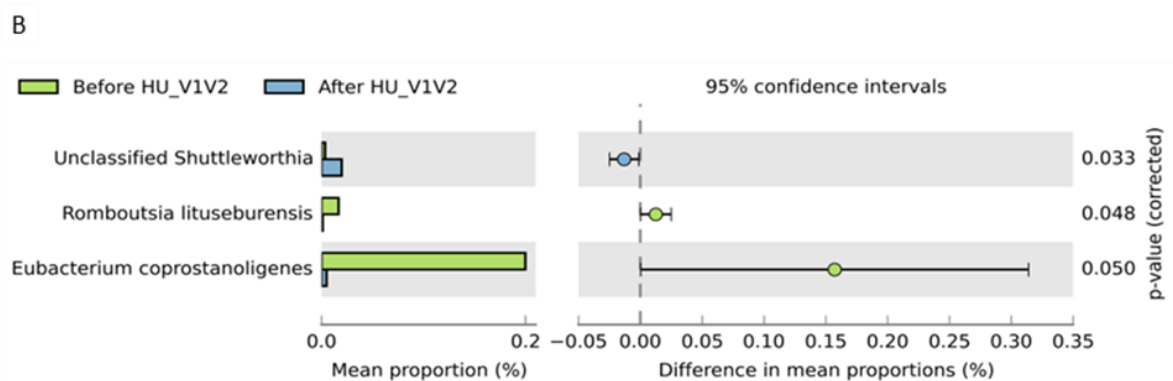
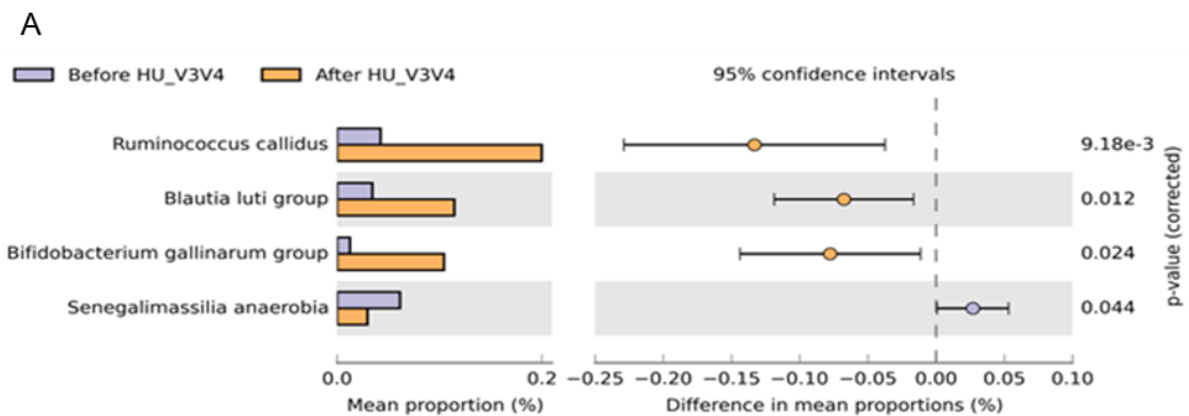
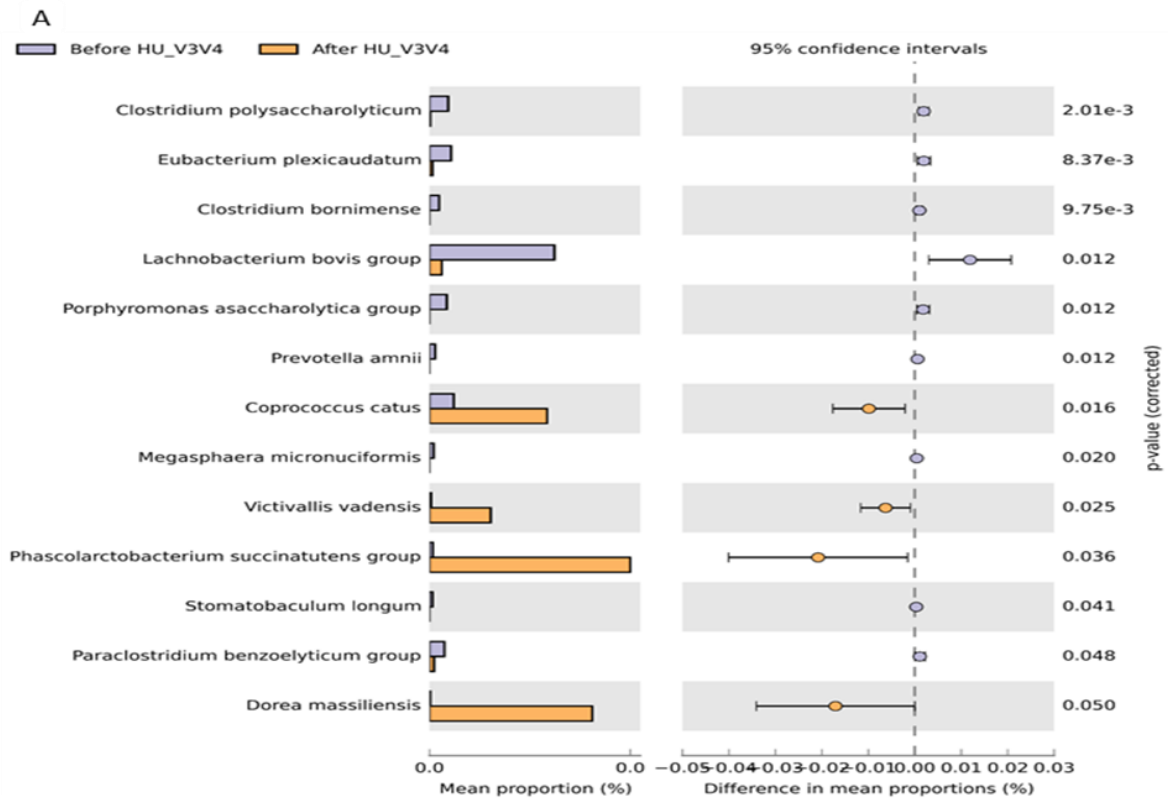


Figura 16 - Taxonomia Espécies bacterianas que registaram diferenças estatisticamente significativas registradas nas regiões V3-V4 e V1-V2 nos períodos antes e depois da administração de HU. A - Espécies bacterianas estatisticamente significativas para a região V3-V4; B – Espécies bacterianas estatisticamente significativas para a região V1-V2. Análise com um teste “*Welch’s t-test*” a um intervalo de confiança de 95%.

4.2.1. Comparação do microbioma em diferentes regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA

Recorrendo aos gráficos gerados pelo software STAMP e, utilizando os mesmos parâmetros estatísticos, *Welch's t-test* com um intervalo de confiança a 95%, foi ainda possível realizar uma comparação entre as diferentes regiões, V1-V2 e V3-V4, para o período antes e depois do tratamento com o fármaco.

Com base nos resultados obtidos para o período anterior ao início do tratamento com HU, para as taxonomias filo e classe é possível observar que: Para o grupo taxonômico Filo constata-se que são mais detetados com maior frequência três categorias de filios bacterianos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, que correspondem aos filios mais relevantes no microbioma intestinal. Observando a (Figura 17-A) é possível concluir que, as sequências da região V1-V2 identificam bactérias do filo *Firmicutes* e de *Proteobacteria*, uma vez que são visualizados em maior quantidade do que em V3-V4. Já as bactérias do filo *Bacteroidetes* possuem uma frequência superior em sequências da região V3-V4, como evidencia a figura.

Para o grupo taxonômico Classe (Figura 17-B) destacam-se três classes de bactérias, *Bacteroidia*, *Clostridia* e *Erysipelotrichi*, cuja frequência é maior. Observando a figura 16-B conclui-se que todas as três classes de bactérias são detetadas com maior frequência em sequências da região V1-V2 do que em V3-V4, para o período pré-HU.

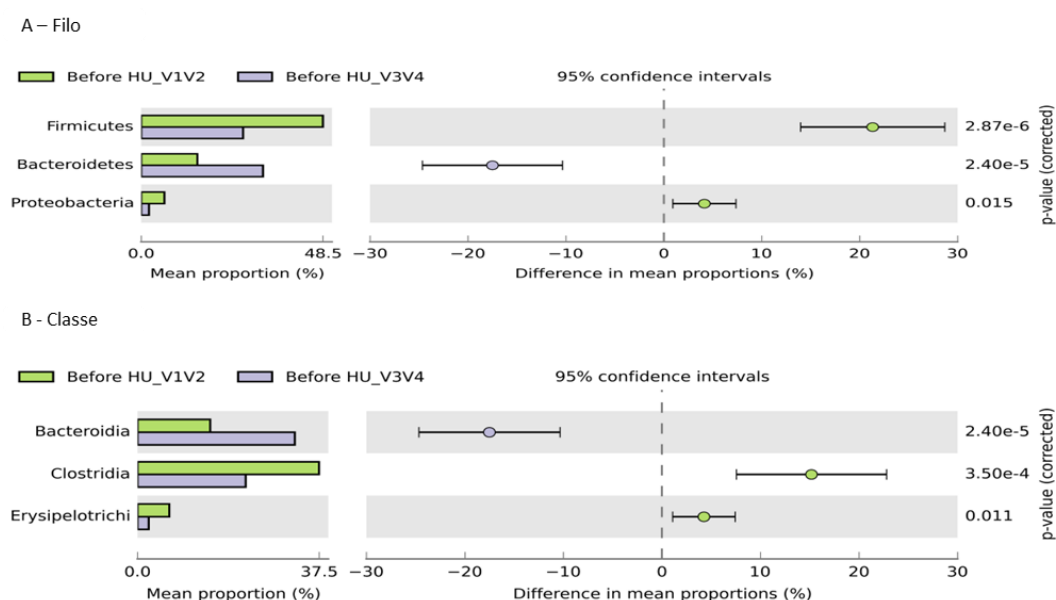


Figura 17 - Comparação dos resultados obtidos durante o período anterior ao tratamento com HU nas regiões V1-V2 e V3-V4 para um teste "*Welch's t-test*" com um intervalo de confiança a 95%. (A) - Taxonomia filo; (B) - Taxonomia classe;

Observando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4 do gene 16S rRNA para o grupo taxonômico Género no período pré-HU destacam-se quatro géneros bacterianos. Pela figura 18 é possível visualizar que os géneros bacterianos *Catenibacterium*, do filo *Bacillota*, *Sporobacter* e *Faecalibacterium*, do filo *Firmicutes*, são mais frequentes em sequências da região V1-V2. Já as bactérias do género *Prevotella*, do filo *Bacteroidetes*, possuem uma detecção superior em sequências da região V3-V4.

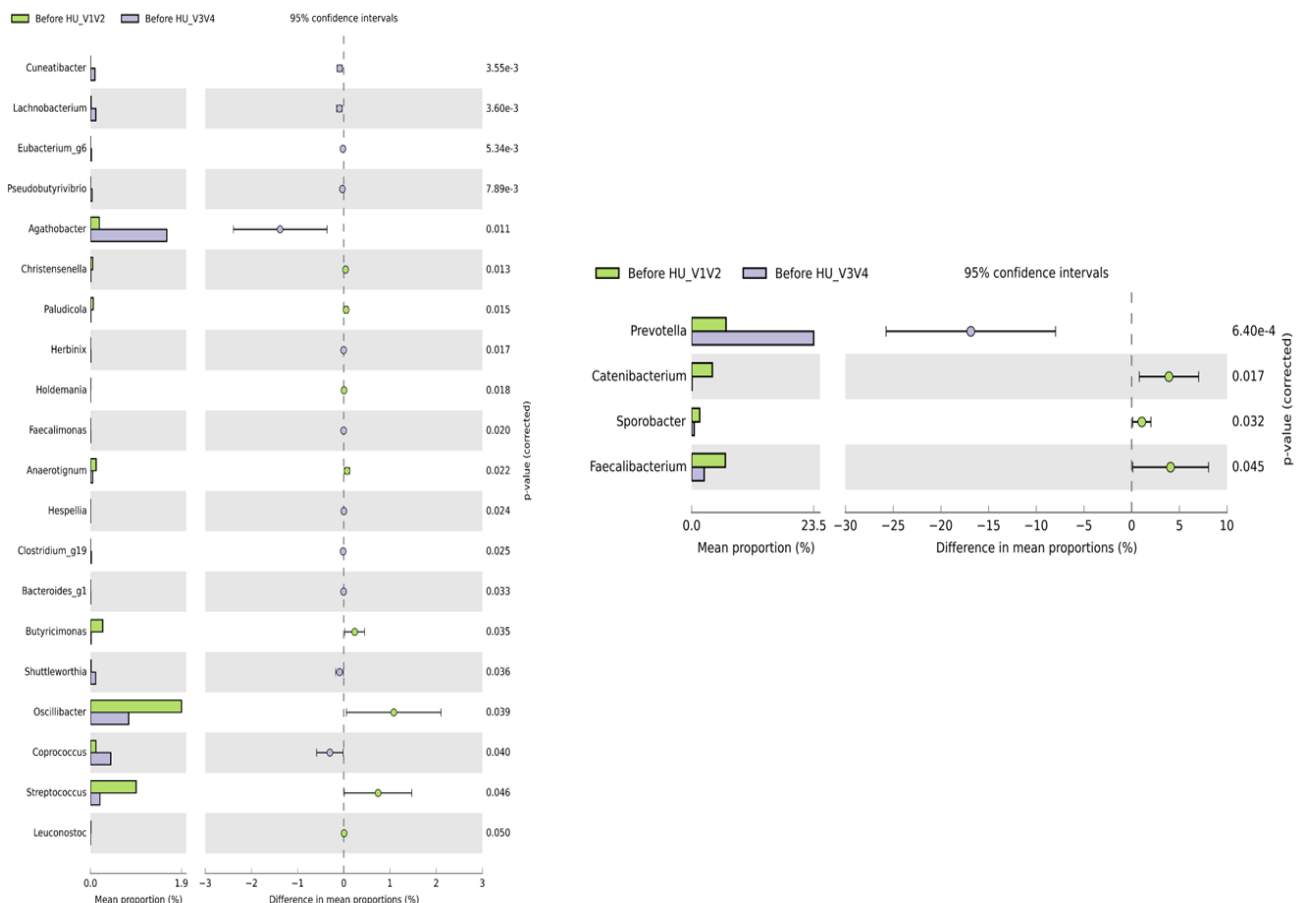


Figura 18 - Comparação dos resultados obtidos durante o período anterior ao tratamento com HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4 do gene 16S rRNA para a taxonomia Género com um teste “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.

Visualizando o último grupo taxonômico, Espécies, para o período descrito, destacam-se três espécies bacterianas. Pela figura 19 verifica-se que as espécies *Streptococcus salivarius group* e a espécie *Ruminococcus faecis*, ambas do filo *Firmicutes*, são mais frequentes em sequências da região V1-V2 do gene 16S. Por outro lado, bactérias pertencentes a espécies como *Collinsella aerofaciens group*, do filo *Actinobacteria*, e *Prevotella copri*, do filo *Bacteroidetes*, surgem com maior frequência em sequências pertencentes à região V3-V4 do gene 16S.

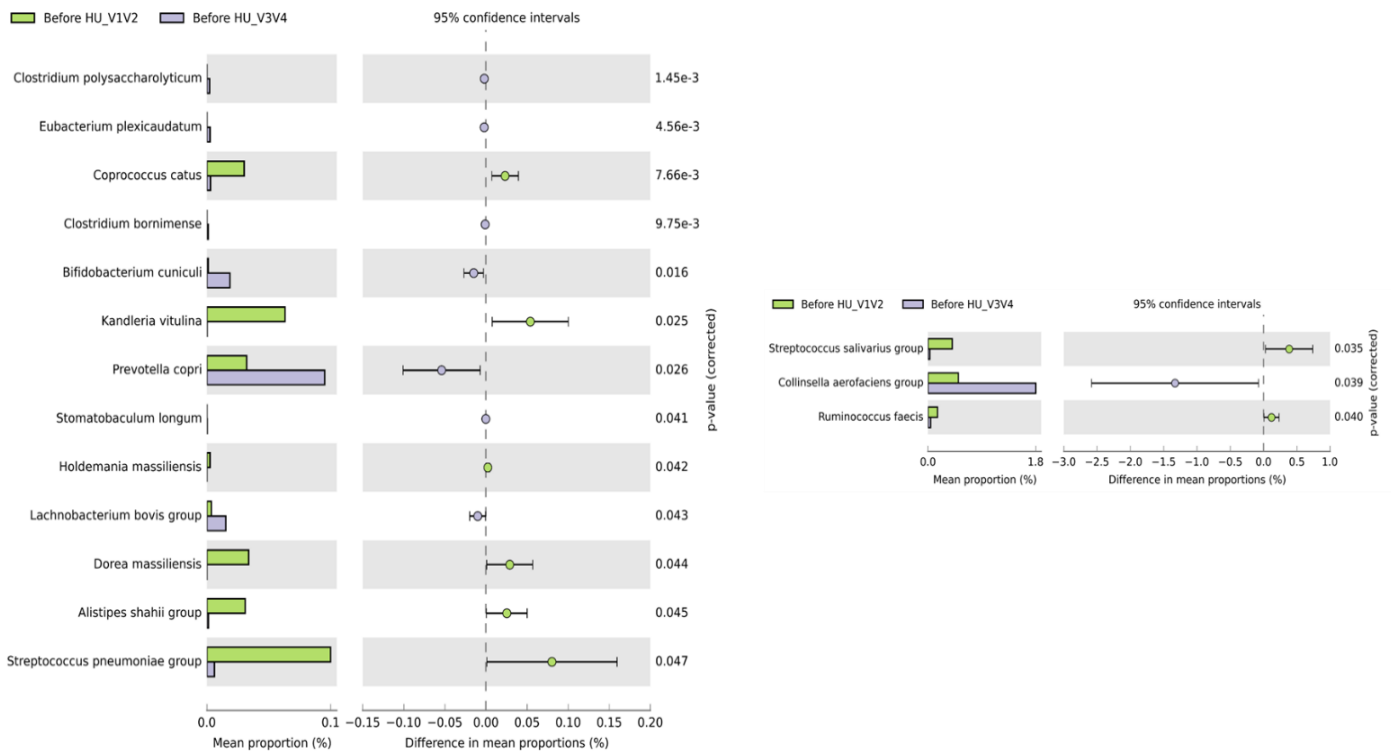


Figura 19 - Comparação dos resultados obtidos durante o período anterior ao tratamento com HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4 para a taxonomia Espécies, com o teste estatístico “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.

Para o período de seis meses após a administração de HU, nas sequências das regiões V1-V2 e V3-V4, foram também registradas diferenças na detecção de determinados grupos taxonômicos. No entanto, notou-se que as diferenças são menores, comparando com o período anterior, uma vez que o número de grupos taxonômicos detetáveis foi mais reduzido.

No período pós-HU, observando o grupo taxonômico Filo, representado na figura 20, observa-se que o único detetável, com os parâmetros selecionados pelo teste estatístico, é *Firmicutes*, que é abundantemente detetável e estudado em sequências da região V1-V2. Na análise anterior, no período pré-HU, este filo foi também mais detetado com a região V1-V2 do que com a V3-V4 (Figura 17-A).

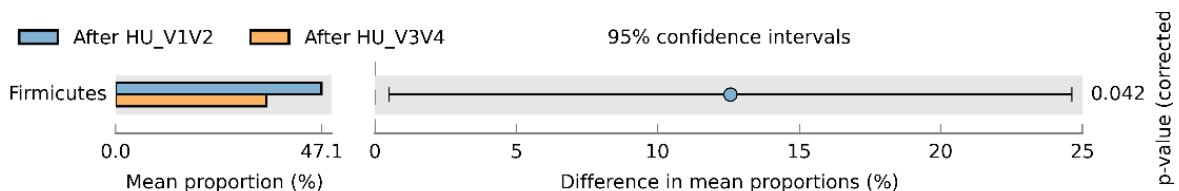


Figura 20 – Filo visualizado no período de seis meses após o início do tratamento com HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4, para um teste “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.

Procedendo à análise estatística relativa à taxonomia Género, são detetáveis dois géneros bacterianos que não foram observados anteriormente no período pré-HU. Observando a figura 21, os géneros bacterianos identificados correspondem a *Atopobium* e *Phascolarctobacterium*, do filo *Firmicutes*, mais frequentes em sequências da região V1-V2 do que em V3-V4.

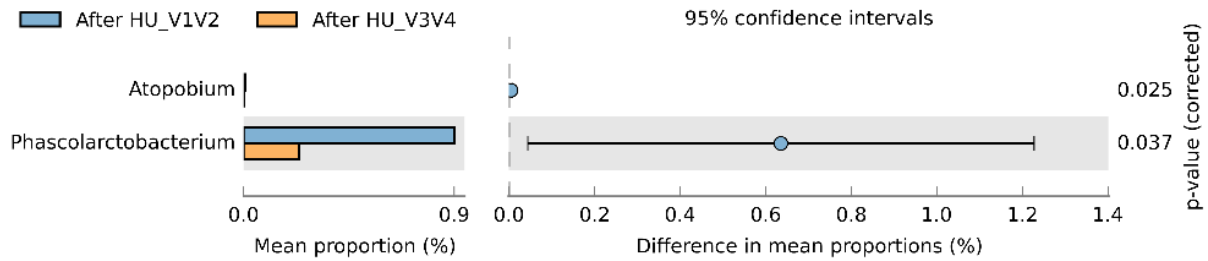


Figura 21 - Comparação dos resultados obtidos para a taxonomia Género durante o período de seis meses após o início do tratamento com HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4, com o teste estatístico “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.

Para a última categoria taxonómica, Espécies, destacam-se cinco grupos de espécies, no entanto menos que as observadas para o período pré-HU. Observando a figura 22, a espécie que surge com maior frequência, de acordo com os parâmetros estatísticos definidos, é *Collinsella aerofaciens group*, do filo *Actinobacteria*, com uma deteção superior em sequências da região V3-V4 do gene 16S, à semelhança do observado no período pré-HU (figura 19). Assim, é possível afirmar que apenas a região V3-V4 consegue diferenciar adequadamente esta espécie bacteriana.

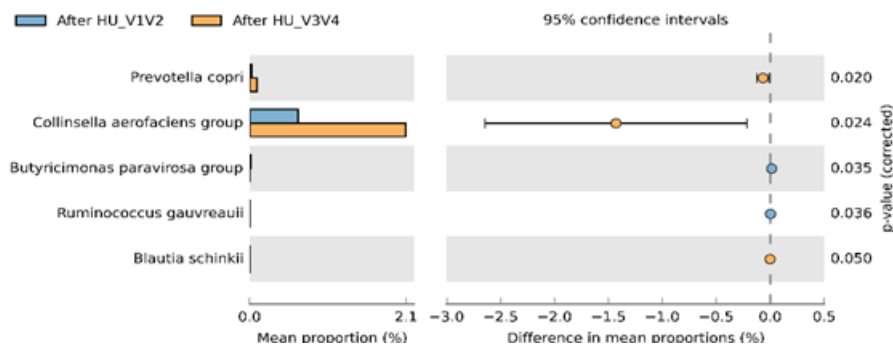


Figura 22- Comparação dos resultados registados para a taxonomia Espécies durante o período pós HU usando as sequências das regiões V1-V2 e V3-V4, com uma análise estatística de “Welch’s t-test” com um intervalo de confiança a 95%.

4.3. Detecção da espécie *Clostridium difficile*

Foram ainda realizados dois PCR's em tempo real (q-PCR) quer para a deteção de bactérias do género *Clostridium/Clostridioides* (Clo-Spp) quer para a deteção de espécies de *C. difficile*. O q-PCR Clo-Spp foi realizado com uma percentagem de eficiência de 100,12 % e verificou-se que todas as amostras amplificaram para o género *Clostridium*. No entanto, quando realizado o PCR para a deteção de espécies *C. difficile* verificou-se que 22 das amostras não amplificam nem para a toxina A nem para B o que significa que são negativas para a presença desta bactéria. Apenas uma das amostras, referente ao período antes de HU, amplificou para ambas as toxinas A e B, o que significa que se regista a presença de bactérias *C. difficile*, como é possível observar nas figuras apresentadas de seguida (figura 23 e figura 24).

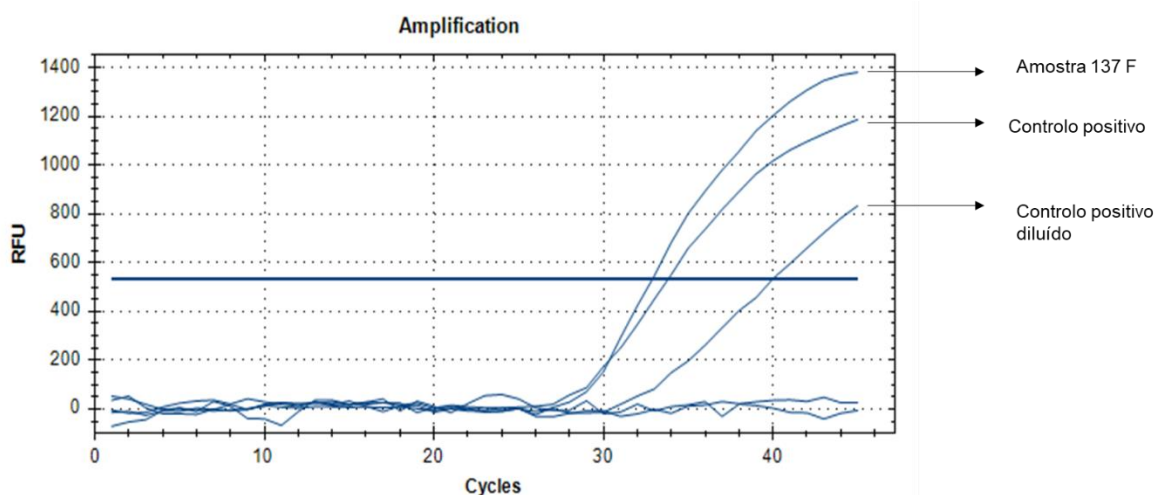


Figura 23 - Amplificação observada no canal FAM que deteta a toxina B

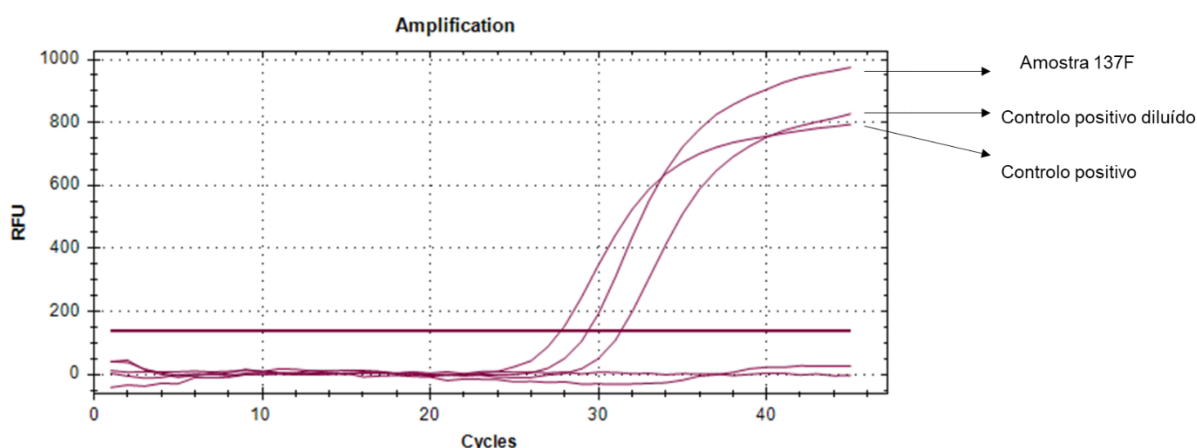


Figura 24 - Amplificação registada no canal VIC que deteta a toxina A

5. Capítulo 5 – Discussão dos resultados

Atualmente o desafio proposto consiste na análise possível do microbioma intestinal de doentes com anemia de células falciformes a fim de compreender o papel das bactérias que compõem a microbiota. O objetivo principal prende-se com o estudo da influência da Hidroxiureia (HU) na patogénese da doença e, do impacto dos efeitos gerados na comunidade bacteriana. Assim, técnicas de sequenciação NGS (*Next Generation Sequencing*) têm vindo a permitir a análise de sequências microbianas através da sequenciação do gene 16S de RNA ribossómico, que constitui o gene mais completo pois permite uma maior identificação de espécies bacterianas e, inclui regiões hipervariáveis e conservadas, permitindo a identificação de grupos taxonómicos bacterianos e, o cálculo de índices de alfa-diversidade (de riqueza e uniformidade)^[56,72]. Estas técnicas de sequenciação permitiram a avaliação da composição microbiana bem como, a associação entre os processos fisiopatológicos e a presença/ausência de determinados grupos bacterianos, revelando a sua importância na manutenção de processos de equilíbrio intestinal^[73].

A HU funciona como um agente indutor terapêutico de HbF que, retarda a polimerização de hemoglobina S, contribuindo com efeitos benéficos como a diminuição da frequência de episódios vaso-oclusivos^[53]. A terapêutica com HU contribui ainda para a diminuição de contagens de neutrófilos envelhecidos e reticulócitos, como propõem *Zhang et al.* o que contribui para uma regulação da disbiose intestinal, regulando a circulação de citocinas inflamatórias que atuam posteriormente em crises falciformes^[74]. Assim, a HU representa um fármaco antineoplásico e citotóxico que, além de atuar em alguns cancros é utilizado como modulador de características de doença falciforme (DF) nomeadamente a nível da composição da microbiota uma vez que, este fármaco é apontado como potencial redutor de alfa-diversidade^[37,75].

Os resultados obtidos através de índices de alfa-diversidade, riqueza de espécies e uniformidade (*ACE, CHAO, Jackknife, Simpson, Shannon, NPS Shannon, Phylogenetic diversity, OTU e Good's coverage library*) foram, na sua maioria, inferiores em amostras colhidas após seis meses da introdução de HU para tratamento da DF tanto em sequências da região V1-V2 como em V3-V4, o que está de acordo com o anteriormente referido. Este facto está de acordo com as conclusões do estudo de *Mohandas et al.* que propõem que, terapêuticas recorrendo a fármacos como HU e outros antibióticos, em pacientes com DF, conduzem a uma diminuição da diversidade presente na microbiota, isto é, uma diminuição de índices de diversidade alfa, reduzindo assim a disbiose intestinal e a frequência de infeções por bactérias patogénicas como *C. difficile*^[37,56].

O trato intestinal possui uma barreira intestinal constituída por células epiteliais, que impede que as bactérias, que colonizam o trato intestinal, possam irromper e contactar com células imunitárias causando diversas reações adversas^[73]. Quando saudável a microbiota intestinal é na sua maioria

composta por espécies bacterianas de diversos filos, sendo os mais abundantes *Firmicutes* e *Bacteroidetes* seguindo-se de *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. No entanto, ao longo do desenvolvimento humano, a composição da microbiota sofre alterações devido nomeadamente à indução de antibióticos e outros fatores como dieta alimentar, podendo, por vezes, conduzir a um desequilíbrio intestinal^[64]. O aumento do desequilíbrio intestinal na microbiota é causado pela dominância de bactérias patogénicas em relação às bactérias comensais e, tem sido cada vez mais associado ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais podendo influenciar na patogénese da DF^[58].

Sabe-se que o microbioma intestinal é dos mais importantes do organismo humano e que, os seus processos como a manutenção de equilíbrio epitelial intestinal, são altamente implicados como moduladores de características da DF. Na literatura é referido que doenças como a DF conduzem a uma perda de diversidade bacteriana e microbiana relacionado com um aumento de colonização por parte de bactérias como *Clostridium difficile*, que constituem um biomarcador correspondente a uma menor diversidade na microbiota intestinal^[37,56]. De uma forma geral os resultados obtidos revelam uma diminuição de espécies *Clostridium* passados seis meses de terapêutica com HU nomeadamente a diminuição de espécies de *Clostridium perfringens* que constitui uma espécie bacteriana não benéfica responsável por conduzir a infeções intestinais, causando diarreias à semelhança de *C.difficile*^[76]. Assim, manter o equilíbrio da microbiota torna-se bastante importante uma vez que, vários estudos relatam que algumas das suas bactérias contribuem para a proteção do organismo a outras infeções^[37]. Tal como bactérias também outros metabolitos como os ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) são fisiologicamente importantes para a manutenção da integridade da microbiota intestinal, influenciando a regulação e manutenção da barreira intestinal^[58,64].

O estudo de bactérias envolvidas e promotoras de disbiose torna-se cada vez mais importante para o tratamento de diversas patologias que afetam a microbiota^[77]. Pensa-se que o mecanismo de equilíbrio da microbiota intestinal que afeta o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (DII), como doença de *Crohn* ou colite ulcerosa, ou ainda obesidade, possa ser idêntico ao que influencia o desequilíbrio e conseqüentemente a resposta intestinal encontrada em pacientes com DF uma vez que a adesão a células epiteliais por parte de determinadas bactérias é idêntica e resulta em processos inflamatórios^[78].

O segundo desafio inicialmente proposto consiste no estudo das regiões V1-V2 e V3-V4 do gene 16S rRNA para que seja possível perceber qual das regiões será mais ou menos informativa para determinados grupos taxonómicos consoante a terapêutica com HU. Os resultados obtidos a partir da sequenciação do gene em sequências das regiões referidas mostraram diferenças na deteção de espécies e grupos taxonómicos bacterianos. Deste modo, torna-se possível considerar que as diferenças na deteção de espécies nas sequências sejam influenciadas pela especificidade de

primers utilizados, sendo os primers V1-V2 mais específicos para determinados grupos taxonômicos e os V3-V4 para outros^[72].

Desta forma, é possível afirmar que se verifica uma diminuição da capacidade de detecção de grupos taxonômicos nas sequências das regiões V1-V2 significando uma detecção inferior de diferenciação de espécies bacterianas presentes nas sequências desta região comparativamente a sequências de V3-V4.

Após a sequenciação do gene 16S os resultados da análise de sequências das regiões V1-V2 e V3-V4 demonstram um aumento de bactérias *Firmicutes* após HU e conseqüentemente uma diminuição dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* com seis meses de terapêutica. Ainda de acordo com os resultados obtidos observou-se um aumento de espécies bacterianas do filo *Firmicutes* tais como, *Ruminococcus callidus*, *Blautia luti* group, *Coprococcus catus*, *Dorea massillensis* e ainda *Bifidobacterium gallinarum* group do filo *Actinobacteria* sendo estas as mais relevantes. Por outro lado, também ao nível da espécie registam-se diminuições principalmente de *Romboutsia lituseburensis* e *Eubacterium coprostanoligenes* do filo *Firmicutes*, bem como da espécie *Senegalimassilia anaerobia* (*Actinobacteria*). Na sequência destes resultados foi possível considerar que sequências da região V3-V4 serão mais informativas para o estudo do filo *Firmicutes*.

Verifica-se ainda que HU contribuiu para a diminuição do número de OTU's observados na maioria das amostras.

De acordo com os resultados descritos, foram registados aumentos e diminuições na frequência de determinadas espécies e géneros bacterianos que podem ser benéficos ou não, sendo que alguns se destacam devido às alterações induzidas pela HU. Uma destas espécies bacterianas é *Blautia luti* group pertencente ao filo *Firmicutes* e cuja HU aumenta a sua frequência.

Na sua maioria as bactérias da espécie *Blautia* são anaeróbias e atuam como potenciais probióticos dificultando a colonização do intestino por parte de bactérias patogénicas como *C. difficile*. O género bacteriano *Blautia*, ao qual pertence a espécie bacteriana *Blautia luti* representa um género de bactérias benéficas para a microbiota intestinal saudável e está associada à manutenção de inúmeros processos que se revelam benéficos em patologias que afetam o intestino^[79]. Doenças que afetam a microbiota intestinal como DII ou obesidade, contribuem para uma redução do crescimento de espécies benéficas como *B. luti* e *Blautia wexlerae*. Estas bactérias, quando em condições equilibradas de abundância, promovem processos anti-inflamatórios que contribuem para a redução da inflamação. Quando em baixas concentrações, estas bactérias são capazes de promover a produção de citocinas pró-inflamatórias favorecendo a inflamação^[79,80].

Dados de um estudo realizado em crianças com obesidade revelaram uma redução da abundância de espécies pertencentes aos géneros *Faecalibacterium* e *Blautia*, resultando numa diminuição de

Firmicutes e um conseqüente aumento de abundância de *Bacteroides* [81]. Tal como na obesidade, o papel desempenhado por bactérias *Blautia* torna-se semelhante em DII uma vez que, estas bactérias comensais atuam na regulação da manutenção do equilíbrio microbiano promovendo a produção de células T (importantes na defesa do organismo) e de AGCC que contribuem com a inibição de processos inflamatórios[79]. Deste modo, o crescimento da abundância de bactérias da espécie *Blautia* como *B. luti group* é associado a uma manutenção eficaz de homeostase intestinal e constitui um relevante indicador de equilíbrio em doenças que afetam a microbiota intestinal, o que poderá ser benéfico no combate à inflamação associada à DF.

As patologias intestinais como as DII e obesidade são responsáveis pelo decaimento da colonização do trato intestinal por bactérias comensais, promovendo o crescimento de bactérias não benéficas[58]. As doenças intestinais (DII) são responsáveis pela redução de espécies das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, do filo *Firmicutes*, que contribuem para um bom ambiente intestinal. Nomeadamente as DII induzem a diminuição de espécies de *Faecalibacterium prausnitzii*, que constitui uma das bactérias principais a microbiota saudável, bem como de bactérias do género *Ruminococcus* especialmente de *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus albus* e de *Ruminococcus callidus*, em comparação com indivíduos saudáveis[58,82]. Estas reduções causadas pelas DII coincidem com os resultados obtidos no presente estudo uma vez que, em seqüências das regiões V3-V4 destacam-se os aumentos de frequência promovidos pela introdução de HU registados em bactérias de *R. callidus* bem como ao nível do género bacteriano *Ruminococcus* ao qual pertence a espécie anteriormente referida.

Estas bactérias, em conjunto com as restantes bactérias comensais essenciais para o bom funcionamento da microbiota intestinal melhoram o ambiente intestinal[55]. No entanto, em patologias como DII, onde se encontram reduzidas, as suas funções são alteradas ou mesmo inibidas. Especialmente as espécies bacterianas do género *Ruminococcus* anteriormente referidas possuem diversas funções que se revelam benéficas. Entre elas destacam-se a produção de acetato (AGCC mais abundante) por *R. albus* que é utilizado pelas bactérias *F. prausnitzii* para gerar butirato, AGCC essencial para a manutenção da saúde intestinal e para o desenvolvimento de células T. Já as espécies *R. bromii* e *R. callidus* efetuam a degradação de polissacarídeos complexos que se tornam importantes fontes de energia para os microrganismos que colonizam o intestino[64,82].

Bactérias pertencentes aos género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* possuem uma função protetora da mucosa intestinal, funcionando como probiótico, isto é, quando em concentrações equilibradas contribuem para a manutenção do equilíbrio intestinal[73]. Normalmente estas bactérias encontram-se em reduzidas concentrações em casos de DII, o que coincide com os resultados obtidos. Nomeadamente para a espécie bacteriana *Bifidobacterium gallinarum group* cuja frequência foi promovida pela HU nas crianças com DF. A maioria das espécies de *Bifidobacterium* juntamente com *Lactobacillus* possuem a função de proteção do organismo contra

a processos inflamatórios, promovendo a estimulação de produção e regulação de interleucina-10 (citocina com poder anti-inflamatório). Espécies de *Lactobacillus* tornam-se ainda agentes essenciais na manutenção da barreira intestinal contribuindo para o impedimento do crescimento de bactérias patogênicas devido à produção de ácido láctico^[58,83]. Os resultados obtidos demonstraram que, a terapêutica com HU contribuiu para o ligeiro aumento da frequência de espécies bacterianas produtoras de ácido láctico nas crianças com DF.

Ambas as regiões hipervariáveis do gene 16S são capazes de detetar a presença de bactérias *Collinsella aerofaciens group*, com uma presença ligeiramente mais acentuada na região V3-V4. Estas estão associadas à fermentação de alguns hidratos para a produção de AGCC na região do colon, essenciais para reações anti-inflamatórias^[84]. Geralmente espécie *C. aerofaciens* encontra-se relacionada com um bom ambiente intestinal sendo que, quando em reduzidas concentrações poderá ser associada a inflamações intestinais. Deste modo, a maior frequência desta espécie após a terapêutica poderá consistir um indicador satisfatório para a DF uma vez que é associada a um ambiente intestinal saudável.

Observou-se ainda a presença de bactérias não benéficas da espécie *C. difficile* na microbiota intestinal de crianças com DF. *C. difficile* consiste numa bactéria gram-positiva, produtora de toxinas e responsável por causar diarreias e infeções. A infeção causada por estas bactérias ocorre principalmente em pacientes hospitalizados e com presença de disbiose, promovendo a patogénese de doenças intestinais^[61]. Em indivíduos com DII a indução de antibióticos poderá contribuir para a ocorrência de um desequilíbrio na produção de ácidos biliares secundários contribuindo para a progressão da colonização por parte destas bactérias patogênicas^[82]. A literatura sugere que condições como doença falciforme contribuem com inúmeros fatores de risco nomeadamente, exposição a antibióticos, frequentes hospitalizações e ainda hipoxias teciduais, que podem conduzir ao crescimento de bactérias *C. difficile*^[85]. De acordo com os resultados obtidos verificou-se uma diminuição da presença destas bactérias após a terapêutica com HU uma vez que, de acordo com os dados obtidos a ocorrência desta espécie apenas é registada numa das amostras referentes a período anterior à administração de HU. Perante estes resultados, é possível afirmar que a hidroxiureia poderá ter contribuído para a redução de infeções causadas por *C. difficile*.

Vários estudos sugerem ainda que, a relação entre os filos bacterianos *Firmicutes*, bactérias que mantém o equilíbrio nutricional através da síntese de ácidos gordos de cadeia curta, e *Bacteroidetes*, responsáveis pela modulação da resposta imunitária, constitui um importante indicador de equilíbrio da microbiota intestinal, contribuindo para a manutenção da estabilidade da microbiota e sendo o seu valor associado a algumas doenças que afetam o intestino^[37,58]. A relação existente entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que constituem os filos dominantes da microbiota, é frequentemente associada a determinados processos inflamatórios que afetam nomeadamente o sistema imune, promovendo patologias como doenças inflamatórias intestinais e diabetes tipo 1 ou

a nível do metabolismo favorecendo o desenvolvimento de condições como obesidade ou diabetes tipo 2^[77]. Para um equilíbrio intestinal microbiano é necessário que a relação *Firmicutes/Bacteroidetes* seja adequada, isto é, que a abundância de *Firmicutes* seja idêntica à abundância de *Bacteroidetes*. Porém, a relação entre estes dois filos pode sofrer alterações podendo constituir a causa ou o efeito do desenvolvimento de algumas perturbações como doenças inflamatórias intestinais ou obesidade. Na obesidade ocorre um aumento de *Firmicutes* e conseqüentemente uma diminuição de *Bacteroidetes*, verificando-se um aumento da relação. Já nas DII verifica-se um aumento de *Bacteroidetes* acompanhado de uma diminuição de *Firmicutes* que está relacionado com a variação do filo de *Proteobacteria*, o que leva a uma diminuição do rácio^[78]. Em DII, as alterações bacterianas são associadas à gravidade da doença observada sendo a abundância desta relação menor em pacientes com Doença de *Crohn* mais grave. De acordo com a literatura a relação *Firmicutes/Bacteroidetes* encontra-se reduzida na microbiota de indivíduos com DF que poderá ser resultado dos efeitos dos eventos isquêmicos teciduais causados pela doença^[37]. O crescimento de alguns géneros bacterianos com características, probióticas nomeadamente, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, contribuem para a manutenção do equilíbrio da relação entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes* influenciando o desenvolvimento de DII ou obesidade^[78]. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a administração de HU contribuiu para a manutenção da relação estabelecida entre os dois filos, auxiliando na regulação da disbiose intestinal. Em geral, perante os resultados obtidos observa-se que a terapêutica com HU contribuiu para a regulação da relação *firmicutes/bacteroidetes*, no entanto, verifica-se que em sequências da região V1-V2 o valor da relação F/B diminui ligeiramente, o que poderá significar uma diminuição da frequência de *firmicutes* nesta região. Já em sequências da região V3-V4 regista-se um ligeiro aumento do valor desta relação, o que indica uma maior frequência de *bacteroidetes*.

6.1. Conclusões

A presente investigação foi realizada recorrendo à análise de um total de 64 amostras de microbioma intestinal de crianças angolanas com anemia das células falciformes. O principal objetivo deste estudo consistiu na avaliação de possíveis efeitos induzidos pelo fármaco Hidroxiureia (HU) no microbioma intestinal destes pacientes baseando-se na pesquisa de variações ao nível de composição, diversidade e riqueza bacterianas presentes no trato intestinal.

Em síntese foram registados os respetivos resultados:

- Os índices de diversidade alfa (que avaliam a riqueza e uniformidade de espécies) foram, de um modo geral, reduzidos após seis meses de administração do fármaco.
- As reduções relativas a alfa diversidade encontradas em sequências das regiões V3-V4 foram significativamente superiores a V1-V2 o que, poderá significar a presença de diferenças significativas de composição e diversidade de espécies induzidas pela HU que não são observadas em V1-V2.
- Relativamente à composição microbiana observou-se um aumento de espécies mais facilmente detetadas em sequências de regiões V3-V4 do que em V1-V2, o que poderá significar que, a análise de sequências de V3-V4 torna-se mais informativa para o estudo de alguns grupos taxonómicos.
- Comparando as alterações microbianas observadas na DF antes da terapêutica com HU com os mecanismos inflamatórios de doenças que afetam o bom funcionamento intestinal como doenças inflamatórias intestinais (DII) ou obesidade, é possível compreender que determinados géneros e espécies bacterianas benéficas entre elas *Ruminococcus callidus* e *Blautia luti*, encontram-se reduzidos no decurso destas patologias. A redução destas espécies contribui para o aumento do risco de colonização do trato intestinal por parte de bactérias não benéficas como *C. difficile* conduzindo ao desenvolvimento de diversas infeções.
- Verificou-se também que a indução de HU contribuiu para o crescimento de espécies dos géneros *Bifidobacterium*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* que possuem características probióticas e influenciam a manutenção da disbiose intestinal, contribuindo para a manutenção da relação existente entre os filos *firmicutes* e *bacteroidetes*.
- De um modo geral, a terapêutica com HU contribui com o aumento da frequência de espécies benéficas produtoras de ácidos gordos e células essenciais para a regulação da barreira intestinal que impede as translocações ocorridas na DF.

Em suma, a doença falciforme é muitas vezes caracterizada por provocar disbiose intestinal uma vez que, os seus mecanismos fisiopatológicos afetam a integridade da barreira intestinal. Deste modo, a terapêutica de HU revela-se essencial, não apenas na regulação de processos vaso-oclusivos e diminuição da necessidade de transfusões como também na manutenção da disbiose intestinal na microbiota causada por esta patologia.

Numa perspetiva da Engenharia Biomédica, o recurso à sequenciação de nova geração (NGS) do gene 16S rRNA torna-se bastante importante para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e para o estudo de como determinadas patologias afetam o microbioma intestinal. A utilização das regiões hipervariáveis como V3-V4 torna-se assim essencial para o estudo do microbioma intestinal uma vez que, constitui uma das regiões mais informativas do gene 16S rRNA podendo fornecer mais informação sobre a composição bacteriana da microbiota intestinal.

6.2. Perspetivas futuras

Vários estudos sugerem que a administração de HU em crianças com anemia das células falciformes possui benefícios relevantes no que respeita a composição do microbioma intestinal e a manutenção de um bom ambiente intestinal funcional. Ainda assim, futuramente serão necessários estudos mais abrangentes no que respeita à dimensão da população estudada uma vez que, o presente estudo foi baseado em 32 amostras provenientes de 16 crianças angolanas, visando períodos de antes e seis meses após o tratamento com o fármaco.

Embora os resultados obtidos sejam capazes de responder ao desafio inicial serão necessários outros estudos para avaliar mais efeitos no microbioma intestinal induzidos pela HU. Poderá também ser interessante o uso de regiões específicas do gene 16S para o estudo de determinados grupos taxonómicos uma vez que, os resultados obtidos revelam uma maior sensibilidade da região V3-V4 para o estudo de bactérias *Firmicutes* quando comparado com V1-V2.

Futuramente, será também de grande interesse a realização de ensaios clínicos com recurso a bactérias que se revelam benéficas como *Blautia luti* e *Ruminococcus callidus* que possam atuar probióticos com o objetivo de regular o ambiente intestinal.

7. Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

1. Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., & Safo, M. K. (2020). Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. In U. Hoeger & J. R. Harris (Eds.), *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* (Vol. 94, pp. 345–382). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_14
2. Marengo-rowe, A. J. (2006). *Structure-function relations of human hemoglobins*. Proceedings of Baylor University Medical Center.
3. Encyclopedia, B. O. (2020). Hemoglobin. In *Encyclopædia Britannica* (pp. 1–2). <https://www.britannica.com/science/hemoglobin>
4. Paikari, A., & Sheehan, V. A. (2018). Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, *180*(2), 189–200. <https://doi.org/10.1111/bjh.15021>
5. Wienert, B., Martyn, G. E., Funnell, A. P. W., Quinlan, K. G. R., & Crossley, M. (2018). Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies. *Trends in Genetics*, *34*(12), 927–940. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.09.004>
6. Kaufman, D. P., Khatrar, J., & Lappin, S. L. (2021). *Physiology, Fetal Hemoglobin*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500011/?report=classic>
7. Sankaran, V. G., & Orkin, S. H. (2013). The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(1), a011643–a011643. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011643>
8. Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X., & Stamatoyannopoulos, G. (2002, November 1). Locus control regions. *Blood*, *100*(9), 3077–3086. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1104>
9. Donze, D., Townes, T. M., & Bieker, J. J. (1995). Role of erythroid Kruppel-like factor in human γ -to β -globin gene switching. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(4), 1955–1959. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1955>
10. Warghade, S., Britto, J., Haryan, R., Dalvi, T., Bendre, R., Chheda, P., Matkar, S., Salunkhe, Y., Chanekar, M., & Shah, N. (2018, January 19). Prevalence of hemoglobin variants and hemoglobinopathies using cation-exchange high-performance liquid chromatography in central reference laboratory of India: A report of 65779 cases. *Journal of Laboratory Physicians*, *10*(01), 073–079. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_57_17
11. Kohne, E. (2011). Hemoglobinopathies Clinical Manifestations, Diagnosis and Treatment. *Medicine*, *108*, 532–540.
12. Weatherall, D. J. (2011, September). *The challenge of haemoglobinopathies in resource-poor countries*. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08742.x>
13. Goonasekera, H. W., Paththinige, C. S., & Dissanayake, V. H. W. (2018). Population Screening for Hemoglobinopathies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *19*(1), 355–380.

<https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035451>

14. Trent, R. J. A. (2006). Diagnosis of hemoglobinopathies. *Clin Biochem Rev*, 27.
15. Williams, T. N., & Weatherall, D. J. (2012). World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011692>
16. He, Z., Hu, Y., Feng, L., Lu, Y., Liu, G., Xi, Y., Wen, L., Xu, X., Xu, K., & Lucia, A. (2006, December 1). Polymorphisms in the HBB gene relate to individual cardiorespiratory adaptation in response to endurance training. *British Journal of Sports Medicine*, 40(12), 998–1002. <https://doi.org/10.1136/bjism.2006.030866>
17. Eaton, W. A. (2020, February). Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. *American Journal of Hematology*, 95(2), 205–211. <https://doi.org/10.1002/ajh.25687>
18. Li, H., Ha, V., & Lykotrafitis, G. (2012). Modeling sickle hemoglobin fibers as one chain of coarse-grained particles. *Journal of Biomechanics*, 45(11), 1947–1951. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.05.016>
19. Somberg, J. C. (2002). American Journal of Therapeutics. *American Journal of Therapeutics*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1097/00045391-200201000-00001>
20. Hempe, J. M., & Craver, R. D. (1999). Laboratory Diagnosis of Structural Hemoglobinopathies and Thalassemias by Capillary Isoelectric Focusing. In *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis* (Vol. 27, pp. 81–98). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-689-4:81>
21. Rees, D. C., Williams, T. N., & Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet*, 376(9757), 2018–2031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X)
22. Saraf, S. L., Molokie, R. E., Nouraie, M., Sable, C. A., Luchtman-Jones, L., Ensing, G. J., Campbell, A. D., Rana, S. R., Niu, X. M., Machado, R. F., Gladwin, M. T., & Gordeuk, V. R. (2014). Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatric Respiratory Reviews*, 15(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2013.11.003>
23. Inusa, B., Hsu, L., Kohli, N., Patel, A., Ominu-Evbota, K., Anie, K., & Atoyebi, W. (2019). Sickle Cell Disease—Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment. In *International Journal of Neonatal Screening* (Vol. 5, Issue 2, p. 20). <https://doi.org/10.3390/ijns5020020>
24. Jastaniah, W. (2011). Epidemiology of sickle cell disease in Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine*, 31(3), 289–293. <https://doi.org/10.4103/0256-4947.81540>
25. Piel, F. B., Steinberg, M. H., & Rees, D. C. (2017). Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 376(16), 1561–1573. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510865>
26. Chakravorty, S., & Williams, T. N. (2015). Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. *Archives of Disease in Childhood*, 100(1), 48–53. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-303773>
27. Borges, E., Tchonhi, C., Couto, C. S. B., Gomes, V., Amorim, A., Prata, M. J., & Brito, M. (2019).

- Unusual β -Globin Haplotype Distribution in Newborns from Bengo, Angola. *Hemoglobin*, 43(3), 149–154. <https://doi.org/10.1080/03630269.2019.1647230>
28. Nietert, P. J., Silverstein, M. D., & Abboud, M. R. (2002). Sick Cell Anaemia. *Pharmacoeconomics*, 20(6), 357–366. <https://doi.org/10.2165/00019053-200220060-00001>
29. McGann, P. T. (2016, June 1). Time to Invest in Sick Cell Anemia as a Global Health Priority. *Pediatrics*, 137(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0348>
30. Delgado, M., Ginete, C., Santos, B., Miranda, A., & Brito, M. (2021). Genotypic diversity among angolan children with sickle cell anemia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph18105417>
31. Lim, S. H., Methé, B. A., Knoll, B. M., Morris, A., & Obaro, S. K. (2018). Invasive non-typhoidal Salmonella in sickle cell disease in Africa: Is increased gut permeability the missing link? *Journal of Translational Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1622-4>
32. Mangla A, Ehsan M, Agarwal N, et al. (2022). Sick Cell Anemia. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482164/>.
33. Yusuf, H. R., Lloyd-Puryear, M. A., Grant, A. M., Parker, C. S., Creary, M. S., & Atrash, H. K. (2011). Sick cell disease: The need for a public health agenda. *American Journal of Preventive Medicine*, 41(6 SUPPL.4), S376–S383. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2011.09.007>
34. Akinsheye, I., Alsultan, A., Solovieff, N., Ngo, D., Baldwin, C. T., Sebastiani, P., Chui, D. H. K., & Steinberg, M. H. (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, 118(1), 19–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-325258>
35. Sauntharajah, Y., Hillery, C. A., Lavelle, D., Molokie, R., Dorn, L., Bressler, L., Gavazova, S., Chen, Y. H., Hoffman, R., & DeSimone, J. (2003). Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. *Blood*, 102(12), 3865–3870. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1738>
36. Johnson, C. S. (2005). Sick Cell Disease. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 19(5), xi–xiii. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2005.09.001>
37. Brim, H., Taylor, J., Abbas, M., Vilmenay, K., Darempouran, M., Varma, S., Lee, E., Pace, B., Song-Naba, W. L., Gupta, K., Nekhai, S., O'Neil, P., & Ashktorab, H. (2021). The gut microbiome in sickle cell disease: Characterization and potential implications. *PLOS ONE*, 16(8), e0255956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255956>
38. Lim, S. H., Morris, A., Li, K., Fitch, A. C., Fast, L., Goldberg, L., Quesenberry, M., Sprinz, P., & Methé, B. (2018). Intestinal microbiome analysis revealed dysbiosis in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 93(4), E91–E93. <https://doi.org/10.1002/ajh.25019>
39. Luzzatto, L. (2012). Sick Cell Anaemia and Malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), e2012065. <https://doi.org/10.4084/mjihid.2012.065>
40. Cani, P. D. (2018). Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9), 1716–

1725. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316723>

41. Conran, N., & Belcher, J. D. (2018). Inflammation in sickle cell disease. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 68(2–3), 263–299. <https://doi.org/10.3233/CH-189012>
42. Lim, S. H., Fast, L., & Morris, A. (2016). Sickle cell vaso-occlusive crisis: It's a gut feeling. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1092-5>
43. Canalli, A. A., Franco-Penteado, C. F., Saad, S. T. O., Conran, N., & Costa, F. F. (2008). Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*, 93(4), 605–609. <https://doi.org/10.3324/haematol.12119>
44. Odievre, M.-H., Bony, V., Benkerrou, M., Lapoumeroulie, C., Alberti, C., Ducrocq, R., Jacqz-Aigrain, E., Elion, J., & Cartron, J.-P. (2008). Modulation of erythroid adhesion receptor expression by hydroxyurea in children with sickle cell disease. *Haematologica*, 93(4), 502–510. <https://doi.org/10.3324/haematol.12070>
45. Zago, M. A., & Pinto, A. C. S. (2007). Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 29(3), 207–214. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300003>
46. Matte, A., Zorzi, F., Mazzi, F., Federti, E., Olivieri, O., & De Franceschi, L. (2019). New therapeutic options for the treatment of sickle cell disease. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.4084/mjhid.2019.002>
47. McGann, P. T., & Ware, R. E. (2011). Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? *Current Opinion in Hematology*, 18(3), 158–165. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834521dd>
48. AGENCY, E. M. (n.d.). *Adakveo*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/adakveo>
49. Salinas Cisneros, G., & Thein, S. L. (2020). Recent Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Frontiers in Physiology*, 11(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00435>
50. McGann, P. T., & Ware, R. E. (2015). Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opinion on Drug Safety*, 14(11), 1749–1758. <https://doi.org/10.1517/14740338.2015.1088827>
51. de Dreuzy, E., Bhukhai, K., Leboulch, P., & Payen, E. (2016). Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major. *Biomedical Journal*, 39(1), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.10.001>
52. AGENCY, E. M. (2021). *New treatment for sickle cell disease*. <https://www.ema.europa.eu/en/news/new-treatment-sickle-cell-disease>
53. Williams, T. N., & Thein, S. L. (2018). Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 19(1), 113–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021320>
54. Agrawal, R. K., Patel, R. K., Shah, V., Nainiwal, L., & Trivedi, B. (2014). Hydroxyurea in Sickle

- Cell Disease: Drug Review. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 30(2), 91–96. <https://doi.org/10.1007/s12288-013-0261-4>
55. Thursby, E., & Juge, N. (2017, June 1). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
56. Mohandas, S., Soma, V. L., Tran, T. D. B., Sodergren, E., Ambooken, T., Goldman, D. L., Weinstock, G., & Herold, B. C. (2020). Differences in Gut Microbiome in Hospitalized Immunocompetent vs. Immunocompromised Children, Including Those With Sickle Cell Disease. *Frontiers in Pediatrics*, 8(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.583446>
57. Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1), 69–75. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000139>
58. Morais, J., & Ferreira Da Silva, R. (2019). *O Microbioma na Doença Inflamatória Intestinal*. https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/43357/1/MICF_Joana_Morais_Silva.pdf
59. Vijay, A., & Valdes, A. M. (2022). Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 489–501. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00991-6>
60. Hollister, E. B., Riehle, K., Luna, R. A., Weidler, E. M., Rubio-Gonzales, M., Mistretta, T.-A., Raza, S., Doddapaneni, H. V., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Petrosino, J. F., Shulman, R. J., & Versalovic, J. (2015). Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*, 3(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0101-x>
61. Kouhsari, E., Abbasian, S., Sedighi, M., Yaseri, H. F., Nazari, S., Bialvaei, A. Z., Dahim, P., Mirzaei, E. Z., & Rahbar, M. (2018). Clostridium difficile infection: A review. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, 29(3), 103–109. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000135>
62. Brody, H. (2020). Outlook: The gut microbiome. *Nature*, 577, S5.
63. Dutta, D., Aujla, A., Knoll, B. M., & Lim, S. H. (2020). Intestinal pathophysiological and microbial changes in sickle cell disease: Potential targets for therapeutic intervention. *British Journal of Haematology*, 188(4), 488–493. <https://doi.org/10.1111/bjh.16273>
64. Ribeiro, A. (2015). A Microbiota Intestinal nas Doenças Inflamatórias do Intestino e o Potencial Recurso a Probióticos e Prebióticos. In *Tese de mestrado; Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa*. <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/26038/1/AnaRPRibeiro.pdf>
65. Research, Z. (2016). *ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit*. 1(35), 1–28.
66. Illumina, I. (2019). *Illumina. Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide.*, May, Document # 15031942 v05.
67. Illumina. (2013). 16S Metagenomic Sequencing Library. *Illumina.Com*, B, 1–28. http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-

68. Information, C. (2022). clostridium. *Encyclopædia Britannica*.
<https://www.britannica.com/science/Clostridium>
69. Cruz-Morales, P., Orellana, C. A., Moutafis, G., Moonen, G., Rincon, G., Nielsen, L. K., & Marcellin, E. (2019). Revisiting the Evolution and Taxonomy of Clostridia, a Phylogenomic Update. *Genome Biology and Evolution*, 11(7), 2035–2044. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz096>
70. Kit, B. (2016). *BactoReal*® Kit *Clostridium difficile*. 43(October), 1–9.
71. Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00001.1>
72. Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6(1), 190007. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
73. Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
74. Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J. J., Burk, R. D., Kunisaki, Y., Jang, J. E., Scheiermann, C., Merad, M., & Frenette, P. S. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, 525(7570), 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature15367>
75. Jinna, S., & Khandhar, P. B. (2022). *Hydroxyurea Toxicity*. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537209/>
76. Yao, P., & Annamaraju, P. (2022). *Clostridium Perfringens*. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559049/>
77. Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020, May 19). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*, 12(5), 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
78. Stojanov, S., Berlec, A., & Štrukelj, B. (2020). The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. *Microorganisms*, 8(11), 1715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>
79. Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2021). Blautia —a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*, 13(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>
80. Benítez-Páez, A., Gómez del Pugar, E. M., López-Almela, I., Moya-Pérez, Á., Codoñer-Franch, P., & Sanz, Y. (2020). Depletion of Blautia Species in the Microbiota of Obese Children Relates to Intestinal Inflammation and Metabolic Phenotype Worsening. *MSystems*, 5(2), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00857-19>
81. Zhu, L., Baker, S. S., Gill, C., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R. D., & Gill, S. R. (2013). Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A

connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*, 57(2), 601–609.
<https://doi.org/10.1002/hep.26093>

82. Nagao-Kitamoto, H., & Kamada, N. (2017). Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease. *Immune Network*, 17(1), 1. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.1>
83. Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., & Li, J. (2008). Identification of a Surface Protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 That Adheres to Porcine Gastric Mucin and Human Enterocyte-Like HT-29 Cells. *Current Microbiology*, 57(1), 33–38.
<https://doi.org/10.1007/s00284-008-9148-2>
84. Bag, S., Ghosh, T. S., & Das, B. (2017). Complete Genome Sequence of *Collinsella aerofaciens* Isolated from the Gut of a Healthy Indian Subject. *Genome Announcements*, 5(47), 5–6.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01361-17>
85. Carpio-orantes, L. Del, Sánchez-díaz, J. S., Gabriela, K., Moguel, P., & García-méndez, S. (2019). *Poster Abstracts • OFID 2019: 6 (Suppl 2) • S615 S616 • OFID 2019: 6 (Suppl 2) • Poster Abstracts*. 6(Suppl 2), 615–616.

1: Protocolo para PCR RS334 e digestão RFLP

Procedimento para realização do PCR RS334:

1. Identificar 1 tubo de 1.5 mL e os tubos de PCR 0.2 mL;
2. Preparar o *Master Mix* do PCR (preparar para as amostras pretendidas mais os brancos);

Reagentes:

- *mix platinum* HS II = 12,5 µl;
- *Primer* 1-fw = 0,5 µl;
- *Primer* 67-rv = 0,5 µl;
- H₂O = 0,5 µl;
- DNA = 2 µl;

Volume final = 25 µl em cada tubo de PCR.

3. Colocar 23 µl de *master mix* em cada tubo de PCR;
4. Pipetar 2 µl de DNA, para o tubo de PCR (amplificar o branco da extração e colocar um branco do PCR onde se coloca água);
5. Tapar bem o tubo e colocar no termociclador sob as seguintes condições:

Condições para PCR: 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos (94°C-15 segundos, 60°C-15 segundos, 68°C-15 segundos), 4°C até ao fim.

Digestão RFLP com enzima *Bsu36I*

1. Identificar 1 tubo de 0,2 ml com o número de aluno respetivo, mais os controlos positivos;
2. Preparar a master mix da digestão com a enzima *Bsu36I*;

Reagentes para mix:

- *CutSmart buffer* = 2 µl;
 - *BSU 36I* = 1 µl;
 - H₂O = 2 µl;
3. Adicionar 5 µl de mix juntamente com 15 µl de produto PCR;
 4. Incubar o produto resultante a uma temperatura de 37°C durante 60 minutos.

2: Procedimento para realização de eletroforese

Preparação de um gel de agarose a 2%:

- 3 gramas de agarose;
- 150 ml de TBE (*buffer*);
- 10 μ l de gel red (5 μ L por cada 50 μ L);

Verter o gel no suporte colocado na tina de eletroforese, e colocar os pentes necessários para formação dos poços; esperar 10-15 min até solidificar.

Preparação da eletroforese:

- 2 μ l *loading buffer*;
- 8 μ l de produto PCR;
- 5 μ l *ladder* no primeiro e último poço do gel;
- 100 volts durante 35 segundos;

Visualizar o gel num transiluminador de ultravioleta

3: PCR do polimorfismo RS334

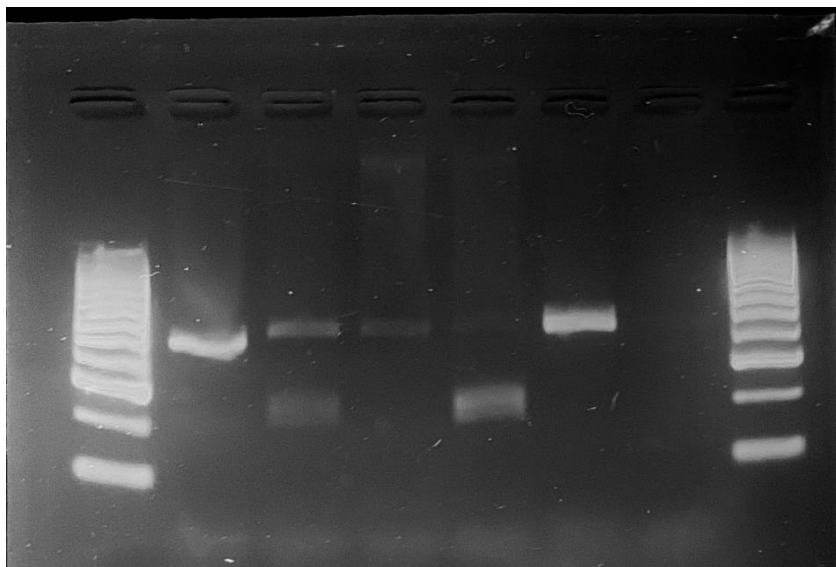


Figura 25 - PCR do polimorfismo RS334 para a classificação das amostras 23F, 23FI, 132F, 132FI e 115F

Resultados da eletroforese:

Amostra 23F – genótipo homozigótico para anemia falciforme (SS);

Amostra 23FI – genótipo heterozigótico (AS) irmão;

Amostra 132F – genótipo homozigótico para anemia falciforme (SS);

Amostra 132FI – genótipo heterozigótico (AS) irmão;

Amostra 115F – genótipo homozigótico para anemia falciforme (SS);

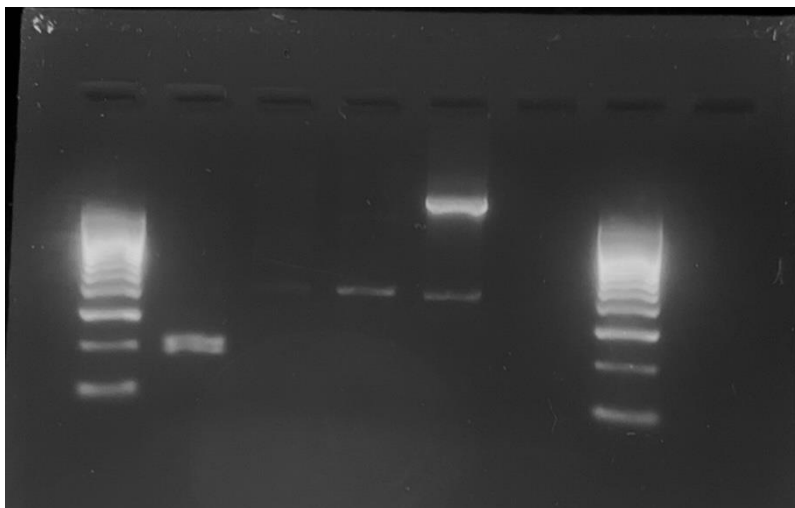


Figura 26 - PCR do polimorfismo RS334 para a caracterização das amostras AF115, Unk1, Unk2 e Unk3

Resultados da eletroforese:

Amostra AF115 – genótipo homocigótico saudável (AA);

Amostra não classificada unk1 – genótipo homocigótico para anemia falciforme (SS);

Amostra não classificada unk2 – genótipo homocigótico para anemia falciforme (SS);