

Universidade Federal do ABC

Gabriel Tognella Poccia

Análise de vias metabólicas do microbioma cutâneo de pacientes de síndrome de Netherton
a partir de dados de metagenômica

Santo André

2023

Gabriel Tognella Poccia

Análise de vias metabólicas do microbioma cutâneo de pacientes de síndrome de Netherton
a partir de dados de metagenômica

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado como requisito para conclusão
do Bacharelado em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal do ABC

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Campos
Paulino

Santo André

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Ao final de 2023, entrego este texto que conclui minhas formações em ciência e tecnologia, e em ciências biológicas. Pouco mais de seis anos após meu primeiro período na UFABC, quatro anos depois de decidir finalmente pelo curso de biologia, e mais de dois anos após começar esse trabalho. A vida realmente não acontece como esperamos e planejamos, mas ela acontece e nos coloca onde deveríamos mesmo estar (se você acreditar nisso) ou simplesmente onde podemos estar. Esses agradecimentos são para registrar algumas das muitas pessoas que estão comigo, ou que já passaram por mim no curso que trilhei até aqui.

Em primeiro lugar, minha família. Aos meus pais Maria de Fátima Tognella Poccia e José Luiz Poccia, a base mais sólida que eu poderia ter tido, que me deram tudo o que tenho e a possibilidade de conquistar muito mais; e que me permitiram sonhar e escolher o que me trouxe até aqui. À minha irmã, Geovana Tognella Poccia, com quem partilho aproximadamente só $\frac{1}{3}$ dos meus genes, mas muitas memórias; que começou a vida um pouco antes de mim para me ajudar a saber onde ir. À minha avó, Maria Aparecida de Jesus Poccia, e em memória dos meus avôs e avó falecidos; em especial, meu avô Raphael Carlos Poccia, uma das primeiras e para sempre a principal influência que eu poderia ter tido, que me ensinou a ser responsável, dedicado e a querer estudar, sem nunca perder a ternura. Eu tive a sorte de ter uma família grande, por isso estendo aos demais esses agradecimentos.

Aos dois primeiros amigos que eu fiz no curso de ciências biológicas, Ana Regina e Samuel, por fazerem da biologia o curso que eu decidi seguir, por todas as risadas e bobagens que falamos, duas pessoas que sou muito feliz de ter encontrado. Aos demais amigos que a biologia também trouxe: Vinícius Goularte, Pedro Medeiros, Hector Alves, Gustavo Pires, Gabriel Olivieri, Roberto Gutierrez e Anna Maria. Eu precisaria de algumas páginas para dizer tudo que tenho a dizer sobre essas pessoas, por isso, deixarei apenas meu obrigado pelo amor e pela amizade. Um agradecimento especial também a Rodrigo Moraes e Bruno Carvalho, dois amigos especiais e eternos. Por fim, menção honrosa para os amigos que já não são mais tão próximos, mas que fizeram da minha vida o que ela é: Eduardo Tioma, Arthur Locatelli, Julia Pickner, Eloisa Camacho, Guilherme Santiago, Pedro Luta, Rafaella Leonel, Julia Borges, Gustavo Ueti e Diogo Kruk.

Dedico um parágrafo especialmente para minha companheira, Roberta Gonzalez. Para mim, é mais fácil escrever um TCC de 80 páginas, ler inúmeros artigos, analisar dados de microbioma e resolver equações do que entender o que é o amor e como amar. Mas, por ela, faz sentido e vale a pena enfrentar essa dificuldade; com ela, eu passo por esse desafio sem

quase perceber. Obrigado por vir e por voltar, obrigado por continuar, obrigado por estar e por agir. Quero você nos agradecimentos dos meus próximos trabalhos, e também quero estar nos seus.

Agradeço à professora Luciana Paulino, pela orientação, dedicação e carinho ao longo desses mais de dois anos, e a todos os colegas do laboratório 507-3 de Santo André. E agradeço a outros professores que também foram muito importantes para mim: Antônio Sérgio Kimus Braz, Luciana Zaterka, Fernando Silva de Moura, Daniel Volpin, Ulisses de Castro, Domitila Padovani, Flávio Fouto, Fábio Tola, Rogério Moreira, José Eduardo da Silva, Diego Perin, Diego Satyro e tantos outros que fazem parte de quem eu sou hoje. Agradeço também a Pedro Penna e Valderes de Conto, meus professores na NAIAD. E, finalmente, agradeço aos professores Danilo do Amaral e Wellington Araújo que aceitaram ser meus avaliadores neste trabalho.

RESUMO

A síndrome de Netherton (SN) é uma condição genética de herança autossômica recessiva causada pela perda de função da proteína inibidora de serino protease LEKTI. Esta síndrome é caracterizada por alterações na pele e alta taxa de mortalidade pós-natal. Evidências recentes apontam variações no microbioma cutâneo, que podem estar relacionadas à produção de metabólitos específicos. Neste estudo, partimos de dados de metagenômica completa de amostras de pele, disponíveis em bancos de dados, e analisamos *in silico* as vias metabólicas dos microbiomas de pacientes com SN em áreas com e sem lesões, comparando com indivíduos saudáveis. Os resultados revelaram diferenças significativas no perfil das vias metabólicas das comunidades microbianas de indivíduos saudáveis e doentes, sem distinção significativa entre áreas com lesão e sem lesão. Identificamos então as vias metabólicas específicas diferencialmente abundantes entre os grupos saudáveis e doentes, o que revelou uma maior proporção de vias de biossíntese de lipídios em indivíduos saudáveis. Concluímos que o estado de saúde está associado ao perfil funcional do microbioma cutâneo e que as alterações no microbioma devem ocorrer de forma sistêmica na pele dos portadores da doença. Deste modo, não é possível atribuir o surgimento de lesões à presença ou ausência específica de uma ou mais vias. Possivelmente, no processo patogênico há um desequilíbrio nos níveis de diferentes lipídios produzidos pelo microbioma, interferindo na regulação de táxons, sua rede de interações ecológicas, e moléculas pró e anti-inflamatórias do hospedeiro. Futuramente, estudos em nível de transcritos e metabólitos poderiam avaliar se há diferenças entre a pele lesionada e a não lesionada nos indivíduos com SN e o que causa o aparecimento das lesões, além de averiguar diretamente os metabólitos derivados das vias metabólicas alteradas e investigar seus possíveis efeitos no processo patogênico.

ABSTRACT

Netherton syndrome (NS) is an autosomal recessive genetic disorder caused by the loss of function of the serine protease inhibitor LEKTI. It is characterized by skin alterations and a high postnatal mortality rate. Recent evidence indicates variations in the cutaneous microbiome, which may be related to the production of specific metabolites. In this study, we utilized metagenomic data from skin samples accessible in databases, performing *in silico* analysis of the microbial metabolic pathways from NS patients with and without lesions, comparing them with healthy individuals. The results revealed significant differences in the metabolic pathway profiles of microbial communities between healthy and diseased individuals, without significant distinction between lesional and nonlesional skin sites. Moreover, we identified specific metabolic pathways differentially abundant between healthy and diseased groups, indicating a higher proportion of lipid biosynthesis pathways in healthy individuals. We concluded that health status is associated with the functional profile of the cutaneous microbiome, and microbiome changes likely occur systematically in the skin of those affected by the disease. Thus, it is not possible to attribute the occurrence of lesions to the presence or absence of specific pathways. Possibly, in the pathogenic process, there is an imbalance in the levels of lipids produced by the microbiome, influencing the regulation of *taxa*, their ecological interaction networks, and host pro- and anti-inflammatory molecules. In the future, transcriptomic and metabolomic studies could assess whether there are differences between lesional and nonlesional skin in NS individuals and the underlying causes of lesion development. Additionally, direct investigation of metabolites derived from altered metabolic pathways could provide insights into their potential effects on the pathogenic process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise de clusters a partir dos valores de abundância relativa de vias metabólicas. Foi utilizado o método “weighted” e distância de Hellinger. No eixo das amostras, os rótulos coloridos representam a classificação da pele de origem da amostra: verde para saudável, amarelo para Síndrome de Netherton sem lesão, vermelho para Síndrome de Netherton com lesão.

Figura 2: Análise de PCoA das abundâncias relativas de vias metabólicas utilizando distância de Hellinger como métrica.

Figura 3: Análise de PCoA das abundância relativa de vias metabólicas apenas das amostras SN, utilizando distância de Hellinger como métrica.

Figura 4: Vias metabólicas diferencialmente abundantes. a) Significância ajustada de acordo com o effect size. b) ID do MetaCyc para Pathways e descrição das vias diferencialmente abundantes na mesma ordem apresentada no gráfico.

Figura 5: Visão geral da via de biossíntese de palmitato II (PWY-5971), mostrando sua conexão com cinco das vias diferencialmente abundantes (indicadas em cores). A via de biossíntese do ácido palmitoleico, por sua vez, é derivada da via de biossíntese do (5Z)-dodecanoato I. Os nomes de metabólitos e vias são derivados do MetaCyc e foram traduzidos livremente.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do teste de permutação sobre a análise de redundância sobre a matriz de distância de Hellinger das abundâncias de vias metabólicas, comparando a classificação em dois ou três grupos.

Tabela 2: Resultados do teste de PERMANOVA sobre a matriz de distância de Hellinger das abundâncias de vias metabólicas, comparando a classificação em dois ou três grupos.

Tabela 3: Contagem de vias diferencialmente abundantes por categoria denominada “Superclass 1”.

Tabela 4: Contagem de vias diferencialmente abundantes classificadas como biossíntese. Categoria denominada “Superclass 2”.

Tabela 5: Contagem de vias diferencialmente abundantes classificadas como degradação, utilização ou assimilação. Categoria denominada “Superclass 2”.

Tabela 6: Contagem de vias diferencialmente abundantes classificadas como fermentação. Categoria denominada “Superclass 3”.

Tabela 7: Detalhamento das vias metabólicas diferencialmente abundantes classificadas com biossíntese de lipídios e ácidos graxos.

Tabela 8: Genes comuns a mais de uma via diferencialmente abundante.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ACC: Acetil-CoA carboxilase

AGCC:  cidos graxos de cadeia curta

AMPs: Peptídeos antimicrobianos

ANOVA: *Analysis of variance*

DA: Dermatite at pica

db-RDA: *Distance based redundancy analysis*

DS: Dermatite seborreica

FASN:  cido graxo sintase

HUMANn: *HMP unified metabolic analysis network*

LEKTI: *Lymphoepithelial Kazal-type related inhibitor*

MaAsLin: *Microbiome multivariate association with linear models*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

PCA: *Principal component analysis*

PCoA: *Principal coordinate analysis*

PERMANOVA: *Permutational multivariate analysis of variance*

PSM : *Phenol-soluble modulin alpha*

QS: *Quorum sensing*

scpA: Estafop ina A

scpB: Estafop ina B

SN: Síndrome de Netherton

SPINK5: *Serine protease inhibitor, Kazal-type 5*

SRA: *Sequence Read Archives*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Estrutura geral da pele humana e de suas comunidades microbiológicas	14
2.2 Interações entre microbioma e hospedeiro humano	16
2.3 Interações ecológicas no microbioma	17
2.4 Lipídios da pele	19
2.5 Síndrome de Netherton e o papel das proteases microbianas	23
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo geral	27
4.2 Objetivos específicos	27
5 METODOLOGIA	28
5.1 Seleção e obtenção dos dados	28
5.2 Identificação de genes e vias metabólicas nas comunidades	29
5.3 Normalização, padronização e cálculo de distância	30
5.4 Análise de agrupamentos a partir das vias metabólicas identificadas	30
5.5 Identificação das vias metabólicas diferencialmente abundantes	32
6 RESULTADOS	32
6.1 Análise de agrupamento e dispersão das amostras a partir da abundância de vias metabólicas	32
6.2 Identificação das vias diferencialmente abundantes	37
6.3 Alterações em vias metabólicas relacionadas a lipídios	43
6.4 Sobre as vias com mais de uma classificação	48
7 DISCUSSÃO	49
8 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A	65
ANEXO B	76
ANEXO C	79

1 INTRODUÇÃO

A existência de comunidades microbianas que colonizam órgãos do organismo humano é uma informação conhecida há bastante tempo e cujos estudos começaram principalmente pelo trato digestório e depois foram expandidos para outras regiões do corpo. As relações estabelecidas ao longo dos anos entre variações nessas comunidades e condições como a obesidade e a intolerância a determinados alimentos certamente colaboraram para o engajamento da comunidade científica neste tema (CRESCI; BAWDEN, 2015; DINAN; CRYAN, 2017; SCHMIDT; RAES; BORK, 2018). Todavia, sabe-se que a presença de microrganismos habitando o corpo humano e nele interagindo tanto de formas positivas quanto negativas com o sistema e outros microrganismos, não está restrita ao trato digestório.

A saber, comunidades microbianas são encontradas nestas condições também no trato respiratório, nas mucosas oral e vaginal e, dentre outros, na pele, que será o foco deste trabalho; e, assim como no trato digestório, certas doenças cutâneas também vêm sendo associadas não a um agente infeccioso específico, mas a uma perturbação na estrutura das comunidades microbianas e em seus nichos. Neste sentido, é de grande interesse para as ciências biológicas e da saúde conhecer as características dessas comunidades, as interações entre microrganismos e deles com a pele, as variações temporais e espaciais, e o efeito de mudanças ambientais e individuais sobre a estrutura do microbioma (CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018).

Nos últimos anos tem sido debatida a necessidade de uma visão mais ecológica sobre os microbiomas humanos, o que poderia trazer uma atenção maior ao papel que as comunidades têm nos processos infecciosos, desafiando a visão “um patógeno - uma doença” proposta por Robert Koch no final do século XIX (BYRD; SEGRE, 2016; GILBERT; LYNCH, 2019). Por trás desta visão, está a noção de que muitos dos conceitos gerais desenvolvidos pela macroecologia podem ser aplicados para o entendimento também das comunidades microbianas, como através da classificação das interações (por exemplo, competição, cooperação, entre outras) e do estabelecimento de redes de co-ocorrência que relacionam as dinâmicas populacionais dos microrganismos e sugerem interações.

Nesse sentido, ainda que microbiota e microbioma por vezes sejam utilizados de forma intercambiável, enquanto em outras vezes diferentes definições são apresentadas a cada termo, faremos uso aqui preferencialmente do termo microbioma da forma como foi proposto por Whipps e colaboradores em 1988, e recentemente defendido por Berg e colaboradores, uma nomenclatura para uma determinada comunidade microbiana em um habitat bem

definido com base em suas características físico-químicas ou abióticas (BERG et al., 2020; WHIPPS; LEWIS; COOKE, 1998). Entendemos que essa definição transmite melhor o entendimento do microbioma não só como o conjunto de microrganismos que habita um local, mas também suas interações entre si e com o hospedeiro, seus metabólitos, material genético e os elementos físico-químicos do ambiente.

Neste trabalho, investigamos o perfil funcional de comunidades cutâneas em pacientes de síndrome de Netherton (SN), uma doença autossômica recessiva caracterizada por profundas alterações estruturais no desenvolvimento da pele que resultam em sintomas clínicos durante toda a vida dos indivíduos portadores, com alta taxa de mortalidade pós-natal. Trabalhamos com os dados de metagenômica produzidos e publicados em artigo de Williams e colaboradores, cujo foco foi fazer uma análise da composição taxonômica das comunidades e investigar moléculas com potencial de induzir ou atuar como protease epidérmica. Neste artigo, os autores apontam que o microbioma não apenas contém variação em relação ao controle saudável, como pode aumentar os sintomas da doença (WILLIAMS et al., 2020). A partir de uma revisão bibliográfica, tentaremos mostrar um recorte do estado da arte das pesquisas sobre microbioma cutâneo e sua relação com doenças de pele.

A presente pesquisa aspira contribuir com o corpo de evidências acerca da influência da SN sobre o microbioma e vice-versa, de modo a não só colaborar com o entendimento desta doença, mas também de outras com alterações no microbioma. Doenças de pele são uma das principais causas de atendimento em saúde primária, e produzem muitos impactos na qualidade de vida das pessoas (SANCLEMENTE et al., 2017). Utilizamos uma estratégia de bioinformática para realizar inferência funcional a partir de dados de metagenômica obtidos em bases de dados públicos, uma abordagem que vem sendo utilizada, mas que nunca foi aplicada para esta síndrome, que seja de nosso conhecimento. O perfil funcional tem sido cada vez mais explorado em trabalhos sobre microbioma e já é entendido como uma propriedade ecológica do microbioma humano (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). Com os resultados obtidos, buscamos mostrar como vias metabólicas parecem ser aplicáveis para caracterização de microbiomas saudáveis e doentes e como vias diferencialmente abundantes nas comunidades indicam um caminho para pesquisas futuras que busquem compreender as características necessárias para a manutenção de uma pele saudável.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura geral da pele humana e de suas comunidades microbiológicas

A pele é um órgão formado por duas camadas: uma mais externa chamada de epiderme, constituída por camadas de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação; e uma mais interna, chamada de derme. De modo geral, a superfície da pele é pouco hidratada, ácida, salina, rica em lipídeos, e aeróbica em quase toda extensão, com exceção das invaginações que formam as glândulas sudoríparas, as glândulas sebáceas e os folículos capilares. Diferentes densidades de glândulas e folículos, associadas a variações na topografia da pele, no entanto, definem microambientes que diferem, principalmente, no nível de umidade e no conteúdo lipídico. Por isso, ao menos três tipos gerais de pele são comumente definidos na literatura: pele oleosa ou sebácea (couro cabeludo, rosto, tórax e costas); pele seca (palmas e face volar do antebraço); e pele úmida (virilha, dobras internas dos joelhos e cotovelos) (STAL; SPIRA; HAMILTON, 1987; WONG et al., 2016; WYSOCKI, 1995). Assim como em um macro ambiente o clima e as características do solo tendem a definir as comunidades animais e vegetais que ali habitam, essas variações fisiológicas ao longo da pele também selecionam diferentes comunidades de microrganismos, combinando arranjos específicos de organismos adaptados às condições de cada região (NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM et al., 2014).

Apesar de encontrarmos espécies com presença ubíqua por toda extensão cutânea e comum em diferentes indivíduos, a abundância relativa desses organismos varia segundo características individuais também (OH et al., 2016). De maneira geral, locais de pele sebácea são dominados por bactérias do gênero *Cutibacterium*, em especial *Cutibacterium acnes*. Por outro lado, as regiões caracterizadas como úmidas abrigam majoritariamente bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. Regiões secas, entretanto, tendem a ser mais diversas. Em relação aos fungos, há menos variação de acordo com o tipo de pele, e o gênero *Malassezia* predomina na maioria dos locais. Além disso, vírus, em especial fagos associados com *Staphylococcus* sp. e *Cutibacterium* sp., são encontrados em todas as regiões. Demais gêneros comumente encontrados, ainda que menos dominantes, são, a saber, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Aspergillus*, *Parachlorella* entre outros (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018).

Essas observações nos revelam que, de fato, a pele atua como habitat e suas características fisiológicas são responsáveis pelas pressões seletivas que moldam as comunidades. Tal entendimento sugere que, em situações onde as propriedades físico-químicas cutâneas são alteradas, seja por fatores externos ou por fatores internos,

pode-se constatar também uma mudança nas pressões seletivas e, no limite, uma alteração na estrutura das comunidades. Assim, compreender como varia uma comunidade no tempo e no espaço pode ajudar a revelar o papel dessas forças evolutivas.

O mesmo trabalho realizado por Oh e colaboradores revelou que microbiomas cutâneos saudáveis são largamente estáveis num período de pelo menos 2 anos; e também são estáveis interpessoalmente, ainda que menos do que na esfera intrapessoal. Regiões menos diversas, como as de pele sebácea, tendem a ser mais estáveis do que as mais diversas, como os pés; apesar disso, de modo geral, as características das diferentes regiões tendem a ser mantidas ao longo do tempo. Por fim, segundo os autores, a estabilidade detectada parece ser mantida por meio da manutenção das linhagens já presentes e não pela obtenção de espécies comuns no ambiente (OH et al., 2016).

2.2 Interações entre microbioma e hospedeiro humano

A descrição da estrutura e composição dos microbiomas humanos encontra lugar nos estudos de saúde humana e animal, uma vez que tem sido defendido nas últimas duas décadas que as comunidades microbianas que habitam o corpo humano exercem, enquanto parte de um ecossistema, funções relacionadas à saúde e também a doenças. Isso significa dizer que os organismos que integram esses espaços, a partir de suas interações com a comunidade e com o ambiente, podem tanto ajudar na manutenção da homeostase, quanto, por alguma razão, sofrer alterações em sua estrutura, potencialmente resultando em uma disbiose; e com isso, no limite, estarem associados a processos patológicos (CHO; BLASER, 2012).

A título de exemplo, foi proposto no início dos anos 2010 uma relação entre a dermatite seborreica (DS) e os fungos do gênero *Malassezia*. Essa associação partiu da observação de que o uso de antifúngicos ajudavam no melhoramento dos sintomas dessa inflamação, vista junto a uma diminuição na contagem de células de organismos do gênero na pele dos pacientes. No entanto, é difícil estabelecer uma relação direta entre os organismos e a doença, uma vez que fungos *Malassezia* sp. também estão presentes em indivíduos saudáveis. Consequentemente, foi oferecida em oposição a hipótese de que os sintomas da DS não estão relacionados à presença ou ausência de um patógeno específico, mas a um processo sistêmico envolvendo alterações no microambiente da pele que mudam as pressões seletivas existentes e produzem uma disbiose. Esta, por sua vez, também causa alterações físico-químicas no ambiente de forma cíclica, aumentando os efeitos da doença (PAULINO, 2017).

A noção de que doenças de pele, tais como dermatite seborreica, psoríase, dermatite atópica (DA), entre outras, são reforçadas ou mantidas por disbioses nas comunidades cutâneas têm sido defendida nos últimos anos conforme avança o entendimento das interações microrganismos-hospedeiro. Hoje, já se sabe que algumas dessas interações, como a ativação e maturação do sistema imunológico, são essenciais para a manutenção do *fitness* do hospedeiro. Mais do que isso, o desenvolvimento de determinados ramos da resposta imunológica parece coincidir com a aquisição de uma comunidade complexa, indicando que certos mecanismos imunes podem ter evoluído e prevalecido em função de uma relação simbiótica com essas comunidades microbianas (BELKAID; HAND, 2014).

De fato, a interação do microbioma com o sistema imune do hospedeiro parece ser um elemento chave na evolução humana, uma vez que a maioria dos encontros entre um microrganismo e o sistema imunológico se dá, não por patógenos, mas pelo microbioma simbiote, segundo revisão já citada de Belkaid e Hand. Um exemplo que ilustra a especificidade destas interações foi observado na ativação, por meio da bactéria comensal da pele *Staphylococcus epidermidis*, de células T CD8⁺ com função singular. Notou-se que as células ativadas pelo microrganismo em questão são essenciais para a restauração cutânea por exibirem um programa transcricional associado com reparo tecidual, diferente das células T CD8⁺ canônicas ou daquelas ativadas por encontros com patógenos (LINEHAN et al., 2018).

As interações, no entanto, não são unidirecionais entre os microrganismos e o hospedeiro. Uma vez que o microbioma utiliza a pele como habitat, é de se esperar que as características físico-químicas do ambiente moldem as características estruturais e genéticas das comunidades. O genoma de espécies do gênero *Malassezia*, por exemplo, conhecidamente sofreu uma larga expansão em relação a lipases secretórias e fosfolipases em comparação com outros gêneros de fungos (WU et al., 2015). Esse enriquecimento é consistente com os locais que esses organismos habitam na pele humana e com a necessidade de utilizar os nutrientes disponibilizados por meio do *sebum* (conjunto de lipídios produzidos e secretados pelas glândulas sebáceas) e do estrato córneo (camada mais externa da pele, formada por células sem núcleo e organelas, os corneócitos); uma vez que esses fungos não produzem os próprios lipídios (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018). Observações como esta levaram os cientistas a argumentar que há um forte processo de coevolução entre o genoma humano e dos organismos simbiotes (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008).

2.3 Interações ecológicas no microbioma

A descrição das interações do microbioma com o hospedeiro pode ser enriquecida por uma compreensão mais ampla do espaço de atividades dos microrganismos. Para isso, precisamos compreender também os tipos e formas de interações entre diferentes membros da mesma espécie, bem como de espécies e domínios diferentes. De fato, interações como mutualismo, cooperação, predação, competição etc, também estão presentes em microbiomas e são definidoras das dinâmicas populacionais e das capacidades funcionais das comunidades (BERG et al., 2020).

Como mencionado anteriormente, a aplicação dos conceitos da macroecologia para o estudo das interações entre microrganismos, bem como entre microrganismos e hospedeiros, é uma abordagem já antiga, mas cuja validade ainda não está clara, dada as diferenças entre os macro-eucariotos, para os quais a teoria ecológica foi originalmente desenvolvida, e os procariotos e micro-eucariotos, no que se refere aos mecanismos de interações e ao estilo de vida (PROSSER et al., 2007).

Nesse sentido, um dos componentes essenciais para as interações ecológicas em microbiomas são os metabólitos secundários. O espaço de interações de um microrganismo é preenchido por moléculas sinalizadoras, toxinas, moléculas orgânicas e inorgânicas que são liberadas pelos organismos seja como produto ou subproduto de seus metabolismos e podem tanto servir positivamente como negativamente para outros organismos. Um exemplo de interação positiva mediada por metabólitos secundários é o “*cross-feeding*”. Nesse mecanismo, apenas um dos lados é beneficiado (+/0) ao utilizar um metabólito que foi descartado por um organismo de outra espécie, como produtos de fermentação, aminoácidos, açúcares digeridos, entre outros (GOYAL et al., 2021). Além disso, a cooperação também é possível, na qual uma espécie apresenta um mecanismo cujo efeito é aumentar o *fitness* de outra espécie, podendo ser uma interação recíproca (+/+) ou não (+/0) (COYTE; RAKOFF-NAHOUM, 2019).

Além de interações positivas, há também interações negativas que envolvem metabólitos secundários. Um exemplo seria a competição (-/-), quando organismos diferentes competem por recursos, como nutrientes, cuja disponibilidade no ambiente é limitada. Além disso, para se beneficiar num cenário em que há competição, um organismo pode produzir e secretar substâncias tóxicas para outros organismos, um tipo de amensalismo (-/0) (COYTE; RAKOFF-NAHOUM, 2019).

É sabido, por exemplo, que alguns organismos comuns na pele humana, como a bactéria *S. epidermidis*, possuem em seu repertório molecular peptídeos com propriedades similares aos peptídeos antimicrobianos (AMPs) do hospedeiro, uma classe de moléculas que

fazem parte da linha de frente do sistema imune, e que são conhecidas por provocar a morte de determinadas bactérias. Por meio dessas moléculas, a bactéria *S. epidermidis* inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus*, um patógeno comum presente na pele e nas narinas, associado a inflamações cutâneas como a dermatite atópica; o que, num contexto de patogenicidade, beneficia o hospedeiro, mas também a própria bactéria inibidora, que limita a população competidora (COGEN et al., 2010).

Em outro exemplo, a bactéria *Corynebacterium accolens* inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, uma bactéria causadora de infecções em crianças e adultos. Em cultura mista, foi observado que *C. accolens* consome triacilgliceróis presentes na superfície da pele humana para suprir suas demandas nutricionais e, como co-produto metabólico, libera ácidos graxos livres que inibem o crescimento de *S. pneumoniae*. Esse achado corrobora com um outro, no qual crianças que não apresentam a espécie *S. pneumoniae* no trato respiratório ou na pele exibem uma superpopulação de *Corynebacterium* sp. (BOMAR et al., 2016).

Um outro mecanismo de interação com importância na definição das dinâmicas de um microbioma é o chamado *quorum sensing* (QS). O QS é um mecanismo de sinalização celular dependente da densidade populacional, capaz de promover mudanças no padrão de interações em uma comunidade. Ele é induzido por pequenas moléculas produzidas por uma população microbiana e cujo efeito só é efetuado quando a população atinge um determinado limiar de densidade populacional. Uma vez atingido esse limiar, o sinal interage com as proteínas receptoras e promove uma alteração da expressão gênica de uma população (ABISADO et al., 2018).

Um exemplo de hipótese de QS foi proposto para a interação de duas espécies comuns na pele humana. A bactéria *S. aureus*, que como já citamos, frequentemente é identificada como patógeno, pode exibir um comportamento comensal dependendo do contexto ecológico. Em um trabalho publicado em 2016, Ramsey e colaboradores testaram a hipótese de o desvio da comensalidade para a patogenicidade da *S. aureus* estar associado com sua exposição a uma população bacteriana de *Corynebacterium striatum*. A partir da análise do transcriptoma de culturas de *S. aureus* com e sem *C. striatum*, foi observado que na presença da segunda espécie, o programa transcricional da primeira teve uma diminuição na expressão de genes associados com a virulência e um aumento na expressão de genes associados ao comensalismo (RAMSEY et al., 2016).

2.4 Lipídios da pele

Das classes de moléculas que compõem o microbioma cutâneo, daremos especial atenção aos lipídios. Tratam-se de moléculas sintetizadas e presentes nas células de todo organismo vivo e que apresentam funções internas essencialmente estruturais e energéticas, mas também sinalizadoras, transportadoras, entre outras. Suas porções hidrofóbicas permitem a formação das membranas celulares que compartimentalizam o conteúdo das células e também o organizam em estruturas menores, chamadas de organelas. As longas cadeias de hidrocarbonetos, por outro lado, são fontes ricas de energia e calor que podem ser produzidas por meio da oxidação das ligações químicas. Lipídios também podem ser produzidos e excretados para a superfície da pele, na qual têm funções de grande importância (NICOLAIDES, 1974).

Uma das principais funções atribuídas aos lipídios presentes na pele humana, em especial os do estrato córneo, é a formação de uma barreira que protege a epiderme contra a perda excessiva de água e contra a penetração de componentes do ambiente com ação inflamatória, como alergênicos e patógenos; de tal modo, supõe-se que alterações na composição saudável dos lipídios do estrato córneo podem resultar em um mal funcionamento da barreira, propiciando a ocorrência de doenças inflamatórias na pele. Esta hipótese é recorrente na literatura, como mostram revisões sobre o tema (JIA et al., 2018; VAN SMEDEN; BOUWSTRA, 2016).

A produção dessas moléculas tem ao menos três principais fontes: as glândulas sebáceas presentes na derme, que sintetizam e secretam triglicerídeos, ácidos graxos, colesteróis e ceras ésteres para a superfície da pele; as células queratinócitos, presentes sobretudo na epiderme, que promovem a síntese e secreção de ceramidas, ácidos graxos e colesteróis no espaço extracelular do estrato córneo; e o microbioma residente, cujos membros podem produzir lipídios em seus metabolismos e liberá-los no ambiente, como os chamados ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), mas também podem utilizar os lipídios produzidos pelo próprio hospedeiro ou por outros microrganismos, sendo, com isso, um importante mediador da composição lipídica da pele (JIA et al., 2018).

Como descrito em seções anteriores, a literatura é bastante robusta na afirmação de que a composição do microbioma cutâneo apresenta diferenças espaciais em função de variações nas características físico-químicas da pele (COSTELLO et al., 2009; NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM, 2014). De tal modo, a composição lipídica da pele entra como fator de peso para a definição das comunidades. Assim, variações neste perfil bioquímico podem ser forças evolutivas importantes por trás de alterações na composição de

comunidades saudáveis, e ou sintomas dessas alterações, como discutido em revisão da bibliografia pertinente (JIA et al., 2018).

Um importante caso de estudo para visualização da influência da composição lipídica sobre o microbioma é a DA, uma inflamação cutânea com alta incidência na população. Embora o papel dos microrganismos e suas interações com a fisiologia da pele ainda sejam pouco compreendidos, há evidências de uma diminuição da diversidade bacteriana em lesões agudas e crônicas da DA, com um aumento significativo na abundância de *S. aureus* (comumente ausente em pessoas saudáveis) e uma diminuição de *S. epidermidis* (bastante comum em pessoas saudáveis) (BAURECHT et al., 2018). Junto disso, o artigo de Baurecht e colaboradores mostra que a composição lipídica está fortemente relacionada com a composição e diversidade bacteriana nos chamados locais prevalentes de DA. Altos níveis de ácidos graxos insaturados de cadeia longa mostraram associação significativa com maiores abundâncias de bactérias lipofílicas como as dos gêneros *Propionibacterium* e *Corynebacterium*. Da mesma forma, a abundância elevada de *S. aureus* mostrou correlação com níveis elevados de determinadas subclasses de ceramidas, em especial nas lesões.

De fato, diversos achados sugerem que o conteúdo lipídico é um importante fator de seleção dos organismos mais abundantes e comuns no microbioma da pele, e também é um elemento mediador da estabilidade dessas comunidades. Em um estudo para análise da diversidade bacteriana do microbioma da pele do rosto de voluntários saudáveis da região de Bangalore, Índia, foi investigado se os níveis de hidratação e de *sebum* dos locais analisados poderiam ser bons preditores de sua diversidade. Observou-se que na região das bochechas o nível de *sebum* está significativamente correlacionado com a composição e diversidade bacteriana, com destaque para o gênero *Propionibacterium*, em especial *C. acnes* (anteriormente *Propionibacterium acnes* (SCHOLZ; KILIAN, 2016)), cuja frequência cresce com o aumento do volume de *sebum* (MUKHERJEE et al., 2016).

O que poderia estar por trás dessa correlação na composição lipídica e na frequência de bactérias do gênero *Cutibacterium*? Uma análise do genoma de *C. acnes*, principal bactéria da pele sebácea, revelou a presença de diversos genes hipotéticos para codificação de lipases, além do já conhecido triacilglicerol lipase, contribuindo para um genoma bastante enriquecido em enzimas de degradação de lipídios (BRÜGGEMANN et al., 2004) e, portanto, compatível com o ambiente em que habita.

No início da década de 1970, Marples e colaboradores mostraram que com a redução na densidade de *C. acnes* no couro cabeludo e na testa, por meio de tratamento com antibiótico, havia também uma redução na quantidade de ácidos graxos livres na superfície da

pele dessas regiões (MARPLES; DOWNING; KLIGMAN, 1971), sugerindo um papel de controle por parte da espécie sobre o conteúdo lipídico. Junto a isso, na década de 1980 também foi elaborada a hipótese de que a colonização da pele humana pela *C. acnes* era possibilitada pela alta quantidade de triglicerídeos no *sebum*, uma vez que em animais, como camundongos, cujas glândulas sebáceas produzem muito pouco ou nenhum triglicerídeo, a espécie *C. acnes* não é detectada (WEBSTER; RUGGIERI; MCGINLEY, 1981).

Uma possível conexão entre estas informações foi elaborada nas décadas seguintes. As bactérias da espécie *C. acnes* parecem habitar em especial a região do folículo pilossebáceo, ou seja, o conjunto da glândula sebácea e folículo piloso. Experimentos *in vitro* mostraram que os lipídios comuns no *sebum* humano não servem como fonte nutricional diretamente, no entanto podem estar associados com aumento da adesão e agregação celular da bactéria (GRIBBON; CUNLIFFE; HOLLAND, 1993). De tal modo, a atividade das lipases extracelulares pode ser um importante fator para a capacidade de colonização deste organismo, bem como um exemplo de como o microbioma pode alterar o ambiente cutâneo.

Embora os achados descritos acima guardem relação com uma única espécie presente no microbioma cutâneo humano, tal espécie não somente é a bactéria mais prevalente e abundante no ambiente em questão, como a perda na sua abundância relativa vem sendo correlacionada com diversas doenças de pele como psoríase, acne, DA e rosácea (ROZAS et al., 2021). Não está claro, no entanto, se a *C. acnes* desempenha um papel direto ou indireto nestas doenças, ou se as alterações vistas na estrutura de suas populações nestes contextos são sintomáticas das disbioses associadas aos distúrbios. Tal brecha na literatura ocorre pois, embora tenhamos uma quantidade modesta de informações sobre as interações microrganismo-microrganismo e microrganismo-hospedeiro, ainda há muito pouca compreensão do efeito dessas interações no nível ecológico.

Há um cenário similar no que se refere ao principal gênero de fungos presente na pele humana, a saber, o gênero *Malassezia*. Dada a ausência de enzimas essenciais do complexo responsável pela síntese de ácidos graxos, quais sejam, a ácido graxo sintase (FASN) e a acetil-CoA carboxilase (ACC), quase todas as espécies do gênero são dependentes de fontes lipídicas contidas no ambiente em que habitam. Essa necessidade é coerente com os múltiplos genes para lipases e fosfolipases de secreção encontrados (XU et al., 2007; WU et al., 2015).

Tais informações enfatizam a importância do metabolismo de lipídios para os principais membros do microbioma de pele humana, colocando a disponibilidade destas moléculas como uma importante pressão seletiva do ambiente cutâneo, e também, a importância da relação na direção contrária, ou seja, o papel do microbioma na definição das

características abióticas do ambiente. De tal maneira, podemos elaborar algumas perguntas que foram pouco exploradas até o momento na literatura, por exemplo, quais lipídios são consumidos e ou produzidos pelos membros do microbioma? Quais as espécies que mais contribuem para a composição lipídica da pele? Como as alterações nas vias metabólicas poderiam estar relacionadas com variações ecológicas e funcionais das comunidades e, no limite, com alterações na saúde da pele? Como fatores genéticos e moleculares associados aos genes das vias, como ortologias, transferências gênicas horizontais, contextos genômicos, expressão gênica entre outros, se relacionam com as variações ecológicas e funcionais?

Em um trabalho recente, Chen e colaboradores conduziram uma análise de predição funcional do microbioma da pele de pacientes acometidos por psoríase e mostraram que diversas vias estão alteradas em comparação com pessoas saudáveis. Os microrganismos apresentaram enriquecimento de diversas vias, incluindo via de metabolismo do ácido linoléico, um ácido graxo relacionado com processos inflamatórios, via de metabolismo de glicerídios e via de biossíntese de ácidos graxos insaturados (CHEN et al., 2021); deste modo, relacionando o microbioma da pele com a regulação do metabolismo de lipídios.

Em função de um processo adaptativo, a capacidade de interagir com o ambiente e explorar recursos como proteínas, açúcares e lipídios específicos, como triacilgliceróis, é uma característica em destaque do microbioma cutâneo humana em comparação com a de outros ambientes, como de microbiomas aquáticos, de solo, de fezes humanas ou mesmo de pele de camundongos (MATHIEU et al., 2013). E dada a importância dos lipídios para a constituição da barreira da pele, em especial ceramidas, colesteróis, triacilgliceróis e ácidos graxos não-esterificados, é esperado que defeitos nas vias de síntese e degradação dessas moléculas estejam associados com doenças relacionadas à pele, tal como exposto em revisão a cerca de variações genéticas em humanos e camundongos (RADNER et al., 2011).

2.5 Síndrome de Netherton e o papel das proteases microbianas

Como tentamos demonstrar, doenças de pele como DA, DS, psoríase, acne, entre outras, são condições profundamente multifatoriais que, embora conectadas com disbioses, dificilmente podem ter sua causalidade atribuída diretamente a um ou alguns microrganismos. Por essa razão, doenças cujas causas são previamente determinadas e sustentadas pela comunidade científica configuram casos que oferecem vantagem para a investigação das influências do microbioma cutâneo na doença, e desta na comunidade microbiológica. Isso se dá, pois uma vez que a causa está determinada é possível saber objetivamente quais

indivíduos são portadores ou não da condição e quais fatores são mais propensos a aumentar os sintomas da doença, por exemplo.

Uma doença cuja causa é determinada e é independente do microbioma é a síndrome de Netherton. A SN é uma doença autossômica recessiva cujos portadores apresentam desde o nascimento a pele com aspecto seco e escamoso (condição chamada de ictiose) por conta de uma formação defeituosa do estrato córneo; um defeito na formação dos cabelos chamado *trichorrhexis invaginata* que faz com que os cabelos cresçam com nós entre os fios, causando um aspecto de cabo de bambu ao microscópio; além de manifestações severas de inflamações e alergias na superfície da pele, com superexpressão de eosinófilos e de anticorpos IgE séricos (TRAUPE, 2012).

Tal doença, sabe-se, é causada por algumas mutações no *locus* 5q16, região que codifica o gene SPINK5 (*serine protease inhibitor, Kazal-type 5*), que levam a perda de função da proteína inibidora de serino protease LEKTI (*lymphoepithelial Kazal-type related inhibitor*) (CHAVANAS et al., 2000). A perda de função da LEKTI provoca um aumento na atividade de serino proteases epidérmicas cuja principal atividade, para a doença, é a degradação de complexos protéicos chamados corneodesmosomas que propiciam adesão entre os corneócitos, células mortas preenchidas de queratina e imersas em uma matriz lipídica que constituem o estrato córneo. Com a degradação desses complexos proteicos, a camada mais superficial do estrato córneo descama, interferindo na regulação da manutenção da espessura da epiderme, podendo resultar em uma ictiose (BRIOT et al., 2009).

De fato, a LEKTI é uma proteína comumente expressa nas camadas mais diferenciadas do tecido epitelial estratificado, em especial na camada granulosa da epiderme, local onde ocorrem modificações finais da cornificação (formação estrato córneo). A ausência de LEKTI na epiderme, portanto, é um fator comum na SN (BITOUN, 2003). Além disso, em estudo com camundongos *knockout* para SPINK5 observou-se o surgimento de efeitos similares aos descritos para a SN, como perda de aderência e coesão do estrato córneo, presença de defeitos na barreira epidérmica que levam à perda de peso e perda transepitérmica de água, defeitos na diferenciação da epiderme, entre outros (DESCARGUES et al., 2005).

De tal modo, a causa da SN parece estar bem definida e relatada na literatura. A perda de função da LEKTI promove um desequilíbrio na atividade proteolítica na epiderme, causando uma descamação excessiva do estrato córneo, uma diferenciação defeituosa nas camadas da epiderme, resultando também em uma série de inflamações na pele. No entanto, SN se manifesta de formas muito distintas na infância e na idade adulta. Em recém nascidos o fenótipo da doença se expressa de forma generalizada, ou seja, toda a pele apresenta os

defeitos de desenvolvimento e ruptura da barreira epidérmica. Ao longo do envelhecimento do indivíduo portador, os sintomas das doenças passam a ser localizados e transitórios na forma de lesões. Por isso, no trabalho original em que esses dados foram coletados, os autores tinham uma hipótese inicial de que alterações locais no microbioma poderiam estar associadas com o surgimento de lesões. Frente a isso, em artigo publicado em 2020, Williams e colaboradores hipotetizaram que também o microbioma cutâneo poderia entrar em disbiose em pacientes com SN e colaborar com um aumento do fenótipo clínico da doença. Para verificar, eles produziram um dos mais profundos sequenciamentos por *shotgun* do microbioma cutâneo até aquele momento, a partir de amostras coletadas de diferentes regiões do tronco e de extremidades, de acordo com a presença ou não de lesões (WILLIAMS et al., 2020).

Nas análises dos dados de sequenciamento, os autores mostraram uma diferenciação na composição taxonômica entre indivíduos saudáveis e indivíduos com SN, mas uma similaridade entre regiões com ou sem lesão dos indivíduos portadores da doença. *C. acnes* foi a bactéria predominante na maioria dos indivíduos saudáveis, enquanto nos indivíduos doentes houve um aumento significativo na abundância de espécies de *Staphylococcus*, em especial *S. aureus* e *S. epidermidis*. Segundo os autores, as diferenças encontradas entre os grupos aqui foram ainda maiores do que as diferenças caracterizadas anteriormente para DA.

Para além das análises dos dados de metagenômica, os autores também publicaram no mesmo artigo resultados de estudos *in vitro*. Foi dada atenção particular para a identificação de moléculas que poderiam acentuar os efeitos da SN e que são produzidas ou cuja produção é estimulada por membros do microbioma cutâneo. Uma das moléculas investigadas foi o PSM α (*phenol-soluble modulín alpha*), um peptídeo produzido por staphylococci que pode induzir a atividade de diversas serino proteases da família das caliceínas em queratinócitos humanos (WILLIAMS et al., 2017). A presença de DNA do operon do gene *psma* foi encontrada elevada em todas as amostras nas quais havia colonização por *S. aureus*, com forte correlação com a severidade observada da doença. Também a presença de mRNA do mesmo gene se mostrou correlacionada com a presença de *S. aureus* nas amostras de SN. Além disso, os autores também testaram cultivar *S. aureus* a partir da coleta em lesões dos indivíduos com SN, e aplicar os isolados de forma epicutânea à pele das costas de roedores. Como resultado, foram observados danos à barreira epidérmica e inflamação visível nos roedores, além do aumento na expressão de citocinas inflamatórias.

Além do PSM α , que atua como indutor de serino proteases, algumas proteases podem ser diretamente secretadas por staphylococci. No estudo, após deleção individual de duas

cisteíno proteases de *S. aureus*, estafoína A e B (*scpA* e *scpB*), foi observada uma diminuição nos efeitos da presença dos isolados na pele das costas de roedores. Ademais, a presença do DNA codante dessas proteínas se mostrou elevada nos indivíduos com SN, em especial naqueles que tiveram contagem absoluta da espécie aumentada. Junto disso, a presença de mRNA dos genes se mostrou acentuada especificamente nas amostras de lesões. Por fim, homólogos da *scpA* e *sppB* de *S. epidermidis* exibiram os exatos mesmos perfis e resultados.

Com isso, os autores do estudo evidenciaram dois pontos principais: (i) os perfis taxonômicos do microbioma cutâneo de indivíduos com SN, quando comparados com indivíduos saudáveis, se mostraram significativamente diferentes, indicando que as alterações epidérmicas da SN podem determinar um perfil diferente de colonização do ambiente, produzindo uma disbiose em relação ao controle. E (ii), o microbioma cutâneo disbiótico pode estar contribuindo com uma intensificação do fenótipo clínico da SN em função da secreção de proteases e do estímulo à produção destas pelo próprio sistema hospedeiro.

Neste sentido, podemos notar que a SN configura com clareza um caso em que um desequilíbrio na estrutura da comunidade simbiote provoca também alterações nas interações ecológicas com o hospedeiro. Mais que isso, revela como além da estrutura das comunidades em si, também o seu espaço de atividades, isto é, as moléculas produzidas e consumidas pelos membros da comunidade, é um elemento importante e até determinante para o resultado destas interações. Em vista disso, entendemos que uma forma de explorar as relações do microbioma cutâneo com doenças como a SN é com base em uma abordagem sistêmica que permita inferir as principais funções e metabólitos presentes nas comunidades e suas eventuais alterações a partir, por exemplo, dos seus perfis metabólicos. Tal abordagem pode viabilizar ainda um estudo com direcionamentos ecológicos mais claros, como a investigação de codependências e interconexões entre funções de diferentes grupos, principais classes de moléculas alteradas, possíveis interações impactadas, entre outros.

3 JUSTIFICATIVA

Doenças de pele são comuns no mundo todo, inclusive no Brasil. Uma doença como a DA, por exemplo, apresenta prevalência estimada em cerca de 7% dos adultos no Brasil, 4,9% dos adultos nos EUA, 3,5% no Canadá, 2,2% na Alemanha, 8,1% na Itália e 2,1% no Japão (BARBAROT et al., 2018; MESQUITA, 2019). Já a SN é uma doença considerada rara, com uma incidência global de 1/200.000 nascimentos e uma prevalência de 1-9/1.000.000 segundo

dados de 2008 (ZAMBRUNO, 2008). Apesar disso, ela está associada a alta mortalidade pós-natal, uma vez que podem ocorrer complicações como infecções bacterianas, hipotermia, perda excessiva de peso e hipernatremia (desidratação extrema causada por níveis de sódio sérico altos) (HAUSSER; ANTON-LAMPRECHT, 1996).

Embora doenças de pele geralmente não representem ameaça à vida, podem provocar impactos profundos na qualidade de vida dos indivíduos. Em um estudo que acompanhou pacientes com acne, psoríase, eczema e pitíriase rósea no período dos 7 aos 18 anos de idade, tanto os pacientes quanto seus pais ou tutores apresentaram uma diminuição significativa nos índices de qualidade de vida, sendo a redução dos índices nos pais inclusive mais acentuada na maioria das condições (MIN et al., 2023). Isso ocorre, dentre outras razões, porque essas doenças afetam a autoimagem dos indivíduos, um elemento essencial na estrutura da personalidade e com impactos para a saúde mental e atitudes em relação ao ambiente, sendo um fator de risco para ansiedade e depressão (SANCLEMENTE et al., 2017).

Frente a este cenário, pretendemos com este trabalho colaborar para o conjunto de conhecimento sobre as relações do microbioma cutâneo com doenças de pele. O perfil funcional do microbioma cutâneo é um elemento menos explorado na literatura, que geralmente traz análises taxonômicas como foco. No entanto, vias metabólicas já são entendidas como uma propriedade ecológica do microbioma humano (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). Como mostramos na revisão, evidências apontam que a SN pode ser agravada pela produção de proteases pelo microbioma, ou pela indução da produção de proteases humanas. Nesse sentido, trabalhos focados neste elemento podem explorar um maior conjunto de genes e funções e eventualmente mapear alterações relevantes.

Assim, pretendemos fornecer novas pistas e hipóteses sobre os possíveis papéis do microbioma no desenvolvimento dos sintomas da SN, e ao mesmo tempo como o microbioma é influenciado pela doença. Além disso, queremos mostrar que é possível produzir conhecimento sem gerar novos dados. Há muitos dados subutilizados nas bases de dados biológicos que podem responder perguntas valiosas. Finalmente, entendemos que nossa metodologia pode vir a ser utilizada em outros trabalhos com foco em outras doenças. Com isso, esperamos contribuir com a descoberta das patogêneses cutâneas, biomarcadores de saúde e doença da pele, e possibilidades de tratamento ou diminuição de sintomas inflamatórios cutâneos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é comparar as vias metabólicas dos microrganismos presentes no microbioma cutâneo de pessoas saudáveis e com SN, e buscar compreender suas relações e relevância para o equilíbrio ecológico das comunidades e das suas interações.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar as vias metabólicas em comunidades cutâneas a partir de dados de metagenoma disponíveis em bancos de dados;
2. Determinar se é possível relacionar o perfil de vias metabólicas com o estado de saúde dos indivíduos testados, e com a presença ou ausência de lesão nos indivíduos SN;
3. Identificar vias metabólicas diferencialmente abundantes entre os grupos avaliados, de modo a apontar possíveis biomarcadores para as diferenças entre as comunidades, caso haja;
4. Analisar as vias identificadas como diferencialmente abundantes e explorar se é possível estabelecer relações delas com fatores que contribuem para uma pele saudável e fatores que podem provocar ou intensificar o aparecimento de lesões;
5. Investigar a presença de vias associadas ao metabolismo de lipídios dentre aquelas diferencialmente abundantes e especular suas possíveis importâncias no contexto estudado.

5 METODOLOGIA

5.1 Seleção e obtenção dos dados

Os dados para realização do trabalho foram selecionados a partir dos critérios de qualidade, disponibilidade e adequação aos objetivos propostos. Foram escolhidos os dados produzidos e publicados por Williams e colaboradores, provenientes de sequenciamento genômico completo de amostras de pele humana de indivíduos saudáveis e indivíduos com diagnóstico de síndrome de Netherton, tanto de regiões contendo lesões (SN lesão) como de regiões sem lesão (SN não lesão) (WILLIAMS et al., 2020) . Os dados foram disponibilizados

pelos autores no banco *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (SAYERS et al., 2022) e podem ser encontrados na seção *BioProjects* sob ID PRJNA551026.

Foram obtidos os arquivos contendo as sequências de *reads* de 17 sequenciamentos que foram analisados no artigo original, sendo 5 de indivíduos saudáveis, 6 de indivíduos SN de região com lesão, e 6 de indivíduos SN de região sem lesão. O *download* foi feito a partir da plataforma *SRA Explorer* (EWELS; DUNCAN; YATES, 2023), que permite o acesso aos arquivos *fastq* disponíveis na seção *Sequence Read Archives* (SRA) do banco. Após algumas análises iniciais dos arquivos com uso de ferramentas como o FastQC (ANDREWS, 2019) e o FastQ Screen (WINGETT; ANDREWS, 2018), que avaliam fatores de arquivos FastQ como qualidade de sequenciamento, conteúdo GC, presença de *adapters*, sequências duplicadas, presença de DNA humano, entre outros, observamos que os arquivos já haviam passado por uma etapa de controle de qualidade dos *reads* anteriormente à disponibilização no banco.

5.2 Identificação de genes e vias metabólicas nas comunidades

Para identificação dos genes e das vias metabólicas presentes nas comunidades cutâneas a partir dos metagenomas, foi utilizado o programa HUMAnN 3.0 (BEGHINI et al., 2021). A análise foi executada em 12 de julho de 2022 utilizando como base de dados genômicos para identificação dos genes o ChocoPhlAn (BEGHINI et al., 2021), banco de pangenomas microbianos desenvolvido especificamente para os módulos do *bioBakery* (MCIVER et al., 2018) (conjunto de ferramentas ao qual o HUMAnN pertence). Como base de dados transcritos para identificação de proteínas foi utilizado a base completa UniRef90 (SUZEK et al., 2015). Ambas bases foram baixadas localmente para a execução, seguindo o manual do programa. Os *outputs* obtidos após a execução foram: um arquivo com a contagem das famílias gênicas, um com a abundância das vias metabólicas, calculada a partir da quantidade de cópias de vias completas (ou seja, com todos os genes da via presentes), e um com a cobertura das vias metabólicas.

De acordo com os objetivos do nosso trabalho, escolhemos desenvolver as análises a partir dos resultados contidos na tabela de abundância de vias metabólicas. Este arquivo detalha a abundância de cada via metabólica identificada na comunidade como uma função das abundâncias dos componentes de reações das vias. Isto é, a abundância de uma via específica é calculada a partir da abundância de cada reação que resulta da soma da quantidade de genes catalisadores da reação.

O HUMAnN 3.0 usa as definições de via do MetaCyc (CASPI et al., 2020) e do MinPath (YE; DOAK, 2009) para identificar o conjunto de vias que melhor explicam as reações observadas em uma comunidade. Os resultados são apresentados tanto em nível de comunidade, quanto estratificados por táxon identificado em nível de espécie. Os *reads* que não foram identificados em nível de espécie são computados como *unclassified*. A abundância de uma via é proporcional ao número de cópias completas da via em uma comunidade, ou seja, se em uma via simples $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$ a abundância de A for dez vezes maior que de B-D, a abundância será compatível com as abundâncias de B-D.

Vale destacar que o valor de abundância de uma via em nível de comunidade não é necessariamente igual à soma dos valores estratificados. Isso ocorre porque, tomando o mesmo exemplo acima, se para a espécie X os genes da via estão numa abundância 5, 5, 10, 10, e para a espécie Y estão em 10, 10, 5, 5, em nível de espécie, ambas teriam 5 cópias da via. Mas em nível de comunidade os valores seriam somados, de modo que as abundâncias computadas seriam 15, 15, 15, 15, totalizando, portanto, 15 cópias completas da via. Deste modo, assumimos a imprecisão que esta escolha gera. Entendemos que isso não invalidaria as análises feitas aqui, apenas colocariam a necessidade de se verificar em outros estudos se as vias e genes estão de fato presentes nas espécies, o que já seria algo necessário mesmo se utilizássemos os dados já estratificados.

Estão presentes ainda no arquivo valores calculados como *unintegrated* e *unmapped*. O primeiro corresponde à abundância de genes que foram identificados, mas não foram integrados a nenhuma via. O segundo representa a abundância de *reads* que não alinharam com qualquer referência nucleotídica ou proteica.

5.3 Normalização, padronização e cálculo de distância

Escolhemos trabalhar com os dados não estratificados em razão da alta quantidade de *reads* com taxonomia não identificada. A separação entre estratificados e não estratificados foi realizada por meio do *script* “*humann_split_stratified_table*”, disponível na biblioteca HUMAnN 3.0.

Após a identificação dos genes e vias metabólicas para cada amostra e separação dos resultados não estratificados, unimos os resultados em uma única tabela utilizando o *script* “*humann_join_tables*” disponível na biblioteca HUMAnN 3.0. Os valores *unmapped* e *unintegrated* foram removidos e a tabela foi normalizada por amostra de modo que a soma dos valores fosse igual a um. Entendemos que manter esses valores poderia influenciar nos

resultados das análises e introduzir erros, uma vez que eles representam ausência de vias, e, portanto, não podem ser interpretados como parte da composição. Além disso, a quantidade de *reads* classificados nestas duas variáveis representaram uma parte grande do total de *reads* analisados, de modo que estes valores receberiam um peso desproporcional após a normalização.

Com a tabela normalizada foi feita uma padronização dos valores utilizando a função “*decostand*” com parâmetro de método “*hellinger*”. A padronização é uma etapa indicada nos protocolos de tratamento de dados ecológicos de modo a garantir que os dados tenham uma escala comum ou uma distribuição específica. A padronização de *hellinger* transforma os dados de maneira que a distância euclidiana entre as amostras seja proporcional à dissimilaridade de *hellinger* entre as distribuições de espécies associadas a essas amostras. A seguir, foi obtida uma matriz de distância a partir da função “*vegdist*” com parâmetro de método “*euclidean*”. Ambas funções “*decostand*” e “*vegdist*” pertencem à biblioteca *Vegan* (OKSANEN et al., 2022) e foi implementada em R (R CORE TEAM, 2021).

Vale mencionar que a etapa de padronização é indicada para dados composicionais para que todas as variáveis tenham o mesmo peso nas análises. Além disso, a distância de *Hellinger* é considerada uma métrica mais adequada para dados composicionais do que métricas clássicas como a euclidiana, que apresenta uma série de problemas para composição de comunidades contendo valores iguais a zero (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001).

5.4 Análise de agrupamentos a partir das vias metabólicas identificadas

Nossa metodologia focou em avaliar especificamente como os estados saudável, SN lesão e SN não lesão estão relacionados com a composição relativa de vias metabólicas das comunidades microbianas cutâneas. Realizamos uma *clusterização* utilizando a função “*clustermap*” da biblioteca *Seaborn* (WASKOM, 2021) para Python (ROSSUM; DRAKE, 2010). A função foi aplicada sobre a tabela com os valores padronizados segundo critério de *Hellinger* obtido na etapa anterior. Utilizamos como parâmetro de métrica “*euclidean*”, de modo que ao ser aplicada sobre os valores padronizados, os *clusters* são construídos a partir de uma matriz de distância de *Hellinger*.

Além da *clusterização*, realizamos uma análise de PCoA (*principal coordinate analysis*) por meio da função “*pcoa*” da biblioteca *scikit-bio* (THE SCIKIT-BIO DEVELOPMENT TEAM, 2022) para Python. A partir dos resultados desta análise, testamos as hipóteses de agrupamentos a partir de um db-RDA (*distance based redundancy analysis*)

(LEGENDRE; ANDERSON, 1999) implementado via R através da função “*capscale*” da biblioteca *Vegan*.

A análise de redundância é um tipo de ordenação restrita cujo objetivo é organizar um conjunto de variáveis descritivas de acordo com suas relações com um conjunto de variáveis preditivas, de modo que seja possível testar a relação entre elas. A db-RDA é baseada numa matriz de dissimilaridade que pode ser escolhida de acordo com as características dos dados, e permite o teste de hipóteses utilizando um modelo ANOVA com permutações.

Neste caso, a abundância relativa de cada via metabólica identificada em cada amostra consiste no grupo de variáveis descritivas, enquanto os metadados formam as variáveis preditivas. De modo a investigar se o conjunto de vias metabólicas permite uma associação consistente e significativa com o estado de saúde, definimos duas formas de classificação das amostras. A primeira consiste em duas categorias, 6 amostras saudáveis e 12 amostras SN; e a segunda em três categorias, 6 amostras saudáveis, 5 amostras SN lesão e 5 amostras SN não lesão. O modelo db-RDA foi aplicado de forma a testar a significância destas duas formas de agrupamento, utilizando a matriz de distância de Hellinger calculada anteriormente.

Enfim, para testar as hipóteses descritas acima, foi aplicado um teste ANOVA a partir da ordenação produzida pelo modelo RDA, utilizando-se a função “*anova.cca*”, e o R^2 pode ser obtido com a função “*RsquareAdj*”, ambas também presentes na biblioteca *Vegan*. Foi utilizado também um teste PERMANOVA (ANDERSON, 2001) via R por meio da função “*adonis2*” da biblioteca *Vegan*. Concluindo esta etapa, foi feito um cálculo de dispersão utilizando as funções “*betadisper*” e “*permutest*”, também da biblioteca *Vegan*.

5.5 Identificação das vias metabólicas diferencialmente abundantes

Para identificação de vias metabólicas específicas significativamente associadas com a origem da amostra que possam estar atuando como marcadores das diferenças entre as comunidades, utilizamos o pacote MaAsLin2 (MALLICK et al., 2021) implementado em R. Este pacote permite apontar associações multivariadas entre elementos de comunidades microbianas e metadados. Da mesma forma feita no teste das hipóteses de agrupamentos, utilizamos a classificação em duas ou três categorias como as variáveis preditivas.

6 RESULTADOS

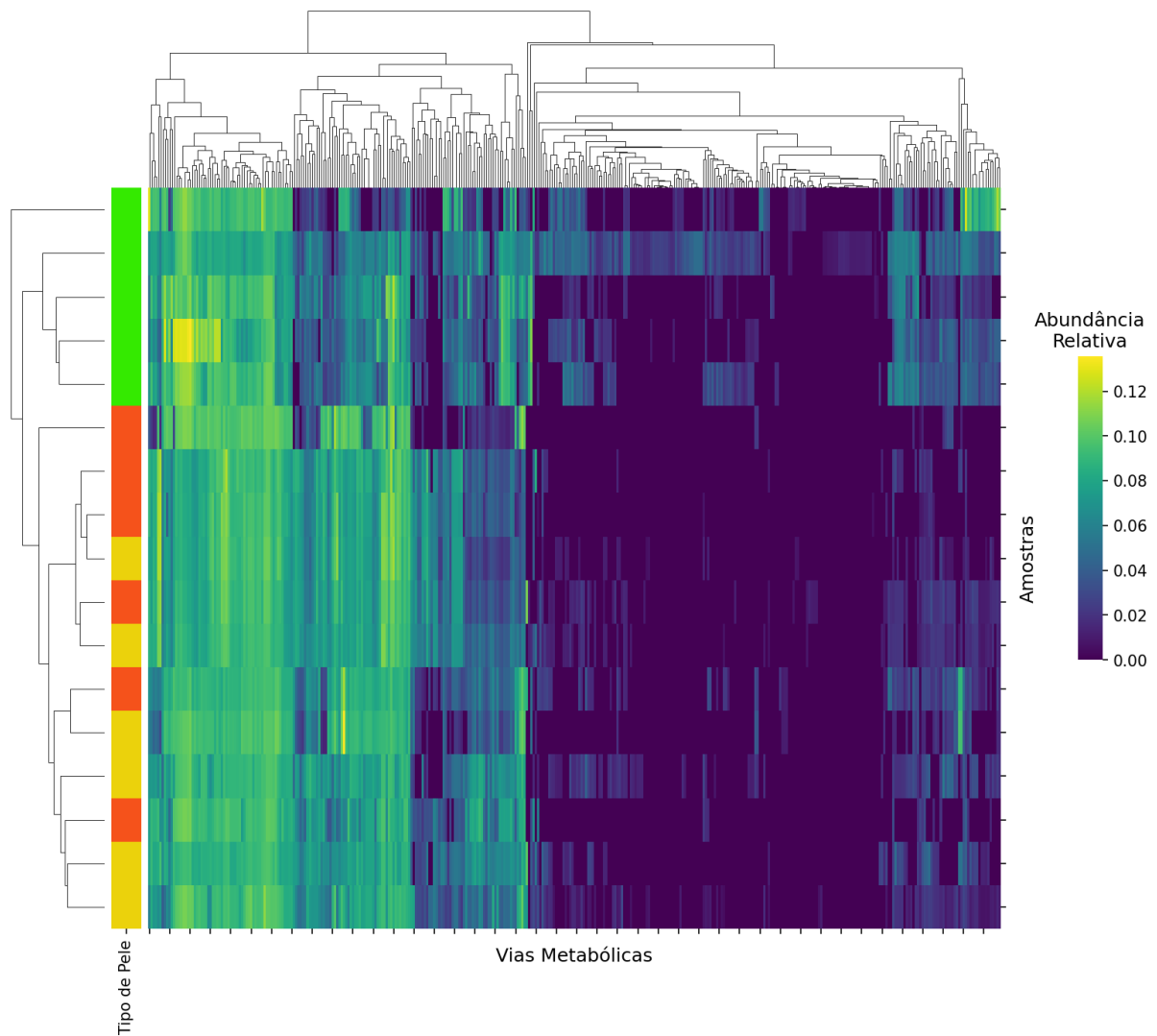
6.1 Análise de agrupamento e dispersão das amostras a partir da abundância de vias metabólicas

A primeira etapa foi a identificação de genes e vias metabólicas nas comunidades com uma análise de *clusters*. Observamos que a *clusterização* das amostras a partir da abundância relativa de vias metabólicas traz um agrupamento dos dados que reflete o estado de saúde do indivíduo de origem de amostra. Mais de um método foi testado revelando pouca variação nos resultados. De modo geral, as amostras dos saudáveis tendem a agrupar mais facilmente variando-se o método, enquanto as amostras dos doentes formam *clusters* que em todos os testes misturam amostras de lesão com de não lesão. Nos resultados obtidos pelo método *weighted* (figura 1), as amostras do fenótipo saudável formam um *cluster* com apenas uma das amostras se posicionando externa ao grupo. Já as amostras de SN formam um segundo grande grupo.

Os resultados desta análise indicam que as amostras SN se parecem mais entre si do que com as amostras saudáveis. Para além disso, podemos apontar que a maior parte das vias metabólicas identificadas não diferem muito entre as amostras, resultando numa grande faixa uniforme na imagem.

A *clusterização* permitiu que identificássemos uma tendência de agrupamento das amostras em torno da classificação em dois grupos, isto é, embora seja possível agrupar a maior parte das amostras de pele saudável, não parece ser possível diferenciar nas amostras de pele SN aquelas que foram obtidas de regiões com lesão das de regiões sem lesão. Assim, parece ser possível que a composição de vias metabólicas nas comunidades cutâneas esteja relacionada com a condição de saúde do indivíduo em relação à SN, diferenciando indivíduos saudáveis de indivíduos que apresentam a síndrome. No entanto, nos indivíduos SN, as comunidades que habitam as regiões com lesão e sem lesão da sua pele, não parecem apresentar uma composição de vias metabólicas suficientemente diferente.

Figura 1: Análise de *clusters* a partir dos valores de abundância relativa de vias metabólicas. Foi utilizado o método “*weighted*” e distância de Hellinger. No eixo das amostras, os rótulos coloridos representam a classificação da pele de origem da amostra: verde para saudável, amarelo para Síndrome de Netherton sem lesão, vermelho para Síndrome de Netherton com lesão.



Fonte: Imagem produzida pelo autor.

Para reavaliar essa hipótese com uma técnica complementar, seguimos com a realização de um PCoA. Esta é uma análise multivariada, similar a outras como o PCA (*principal components analysis*), e tem como objetivo permitir uma identificação visual de agrupamentos a partir de uma matriz de similaridade ou distância baseada em variáveis que foram medidas sobre os itens. Na PCoA, é possível utilizar diferentes tipos de variáveis, contínuas, discretas, ordinais, etc. Além disso, ela permite o cômputo de diferentes métricas de distância, e não apenas a euclidiana como no caso da PCA.

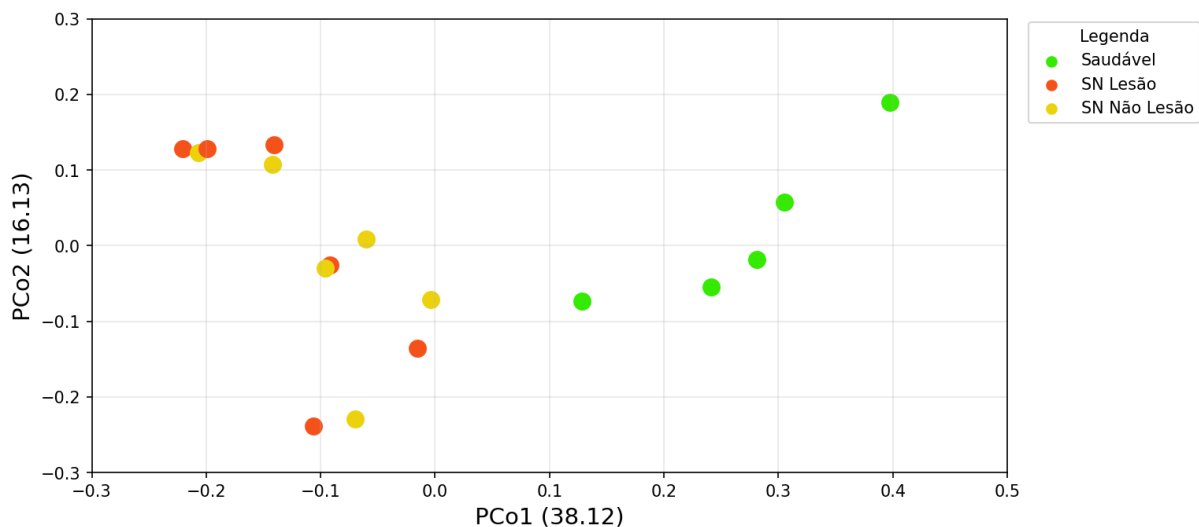
Ao realizar esta análise, portanto, pretendemos investigar se as vias metabólicas são variáveis que se distribuem de modo suficientemente diferente entre as comunidades microbianas presentes na pele de indivíduos saudáveis e as presentes na pele de indivíduos

SN. Além disso, pretendemos identificar se os grupos classificados como SN lesão e SN não lesão são também diferentes entre si em relação a estas mesmas variáveis.

O resultado da análise de PCoA (figura 2) indica uma separação bastante clara entre os grupos saudáveis e os grupos SN ao longo da primeira coordenada principal, no eixo x. No entanto, os grupos lesão e não lesão não apresentam uma separação clara. Este resultado corrobora com a hipótese proposta a partir da *clusterização*, qual seja, de que os grupos saudável e SN podem ser diferenciados a partir da abundância relativa de vias metabólicas identificadas no microbioma cutâneo, mas os grupos SN lesão e SN não lesão, não são suficientemente diferentes em relação às variáveis medidas.

O resultado do PCoA parece sugerir ainda que as vias metabólicas de indivíduos com SN também são mais diversas entre si, provocando um espalhamento maior dos dados ao longo das duas primeiras coordenadas principais. Este comportamento sugere que, embora a doença possa apresentar uma manifestação clínica local, como uma lesão, os efeitos dela são sistêmicos, isto é, mesmo o microbioma de uma região da pele sem lesão exibe uma composição de vias metabólicas diferente da dos indivíduos saudáveis.

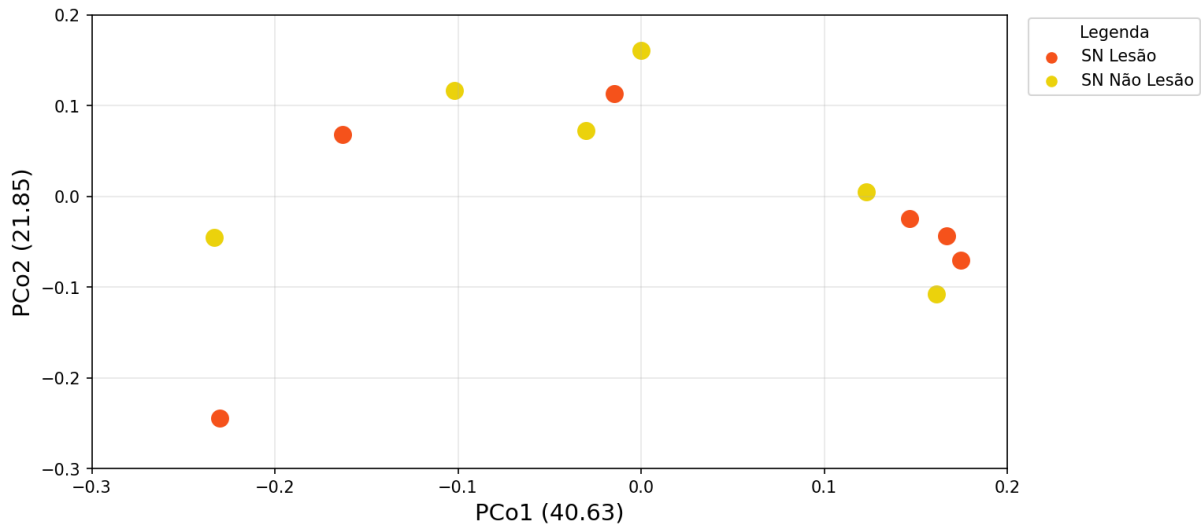
Figura 2: Análise de PCoA das abundâncias relativas de vias metabólicas utilizando distância de Hellinger como métrica.



Fonte: Imagem produzida pelo autor.

De modo a verificar se no PCoA que fizemos com todos os dados não há uma coordenada com menos significância na qual as amostras SN se diferenciam, aplicamos o modelo somente aos dados SN (figura 3) e, novamente, verificamos que as amostras permanecem misturadas.

Figura 3: Análise de PCoA das abundância relativa de vias metabólicas apenas das amostras SN, utilizando distância de Hellinger como métrica.



Fonte: Figura produzida pelo autor.

Para verificar se esses resultados visualizados por meio do PCoA têm significância estatística, realizamos um db-RDA utilizando a mesma matriz calculada para a PCoA e testamos o agrupamento das amostras em duas ou três categorias. Para visualização dos resultados, optamos por chamar o agrupamento em duas categorias (saudável e SN) de “classe”, e o agrupamento em três categorias (saudável, SN lesão e SN não lesão) de “subclasse”. Os resultados obtidos após aplicação de um teste de permutações sobre as ordenações calculadas pelo modelo db-RDA, de modo a obter a significância dos eixos de representação da relação entre as variáveis preditivas e a composição de vias metabólicas, estão sumarizados na tabela 1.

Os resultados apontam para uma significância global (F) relevante e um suporte estatístico ($\text{Pr}(>F)$) significativo para a relação entre as abundâncias das vias metabólicas e as variáveis chamadas de “classe”, indicando que a separação das amostras em um grupo saudável e um grupo SN apresenta significância estatística. Para a separação das amostras em três categorias, no entanto, não houve significância nem suporte estatístico. O R^2 observado foi de 0,35 e o R^2 ajustado de 0,25. Estes são valores baixos e indicam uma relação linear fraca entre os dados e as variáveis preditoras.

Tabela 1: Resultados do teste de permutação sobre a análise de redundância sobre a matriz de distância de Hellinger das abundâncias de vias metabólicas, comparando a classificação em dois ou três grupos.

	F	Pr(>F)
Classe	7,2360736	0,001
Subclasse	0,3556597	0,989

Fonte: Tabela produzida pelo autor.

Por último, foi realizada a PERMANOVA para testar as hipóteses novamente. Os resultados desta análise (tabela 2) indicam também que a divisão em dois grupos é uma hipótese válida para explicação da organização dos dados, enquanto a divisão em três não é suportada. Apesar disso, é importante notar que o R^2 calculado é baixo e, portanto, indica uma relação linear fraca entre os dados de abundância e as variáveis preditoras.

Tabela 2: Resultados do teste de PERMANOVA sobre a matriz de distância de Hellinger das abundâncias de vias metabólicas, comparando a classificação em dois ou três grupos.

	R²	F	Pr(>F)
Classe	0,33513167	7,2360736	0,001
Subclasse	0,01647203	0,3556597	0,991

Fonte: Tabela produzida pelo autor.

Alguns autores destacam que testes como o PERMANOVA não são capazes de apontar se as diferenças estatísticas encontradas são, de fato, produto da posição dos dados, ou seja, da distância entre eles, ou se são resultado da dispersão dos dados. Ou seja, se a diferença encontrada é resultado das diferenças de composição ou da variação normal dentro do grupo (ANDERSON; WALSH, 2013). Para responder a essa questão, segundo os autores, é necessário realizar um teste de dispersão para verificar se há heterogeneidade das variâncias entre os grupos testados. Se o teste identificar uma heterogeneidade significativa, então poderíamos entender que as diferenças entre os grupos se dá por um fator de dispersão. Nosso teste de dispersão com os dados, no entanto, retornou um valor Pseudo-P de 0,321, indicando que a hipótese de homogeneidade não é violada e, portanto, a dispersão não explicaria a diferença entre os grupos.

Finalmente, os testes realizados apoiam a hipótese das vias metabólicas como variáveis que permitem agrupar as amostras em dois grupos, saudável e SN, mas rejeitam a diferenciação das amostras de regiões com lesão e sem lesão. Este é um resultado importante, pois revela que as vias metabólicas podem estar diferentes de forma consistente entre os

indivíduos testados, apontando para a possibilidade de que diferenças funcionais entre as comunidades analisadas estejam relacionadas com a doença subjacente.

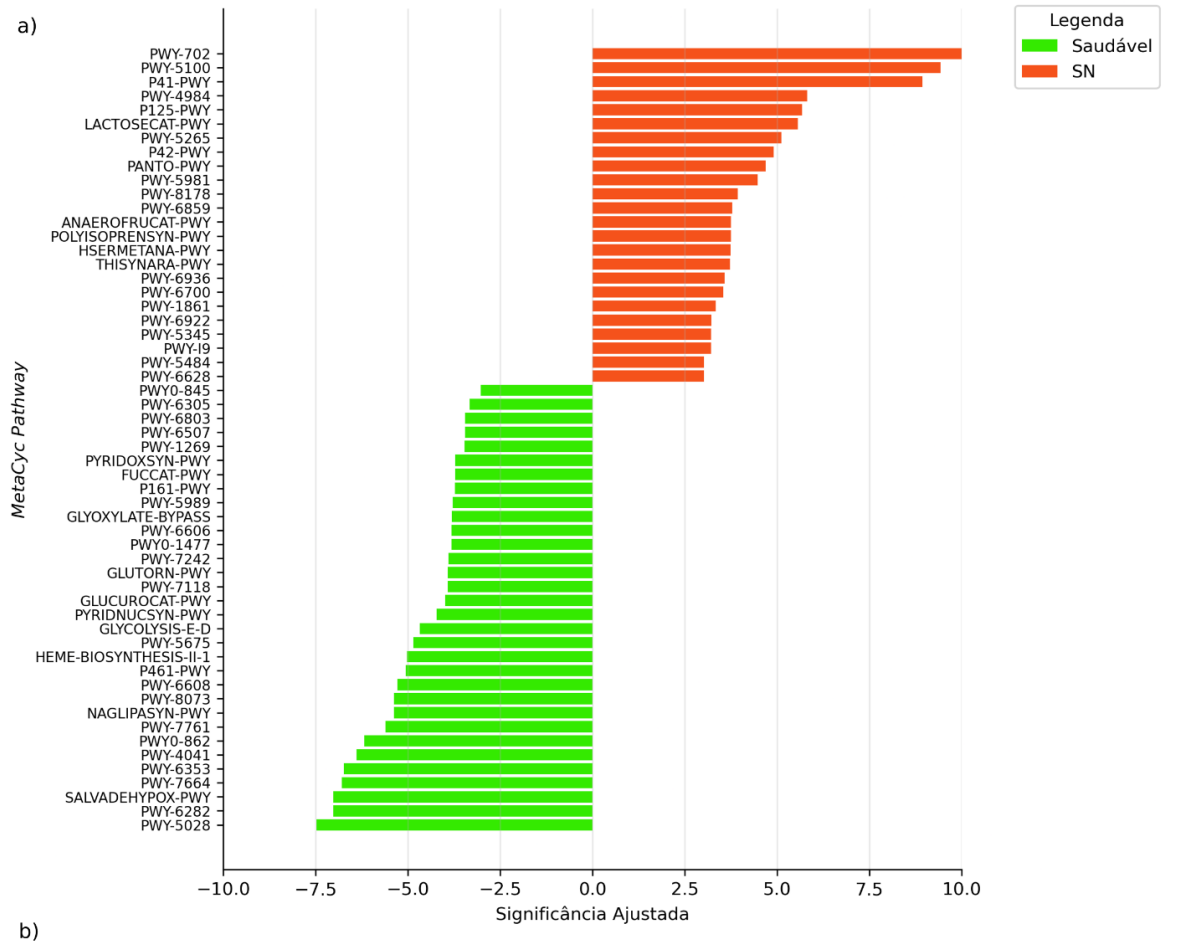
6.2 Identificação das vias diferencialmente abundantes

A partir da hipótese de que é possível classificar as comunidades como saudáveis ou SN a partir dos dados de composição de vias metabólicas, verificada no item anterior, passamos para a busca das principais vias responsáveis por promover essa diferenciação. Pretendemos explorar a possibilidade de eleger biomarcadores microbianos com suporte estatístico para as condições de saúde. Para além disso, investigar esta questão pode ajudar a determinar se há significados biológicos para esses biomarcadores que possam contribuir com a compreensão de disbioses cutâneas específicas para a síndrome em questão e também para outros contextos de desequilíbrio microecológico.

Para identificação dos biomarcadores, testamos a existência de abundâncias relativas diferenciais com suporte estatístico comparando novamente a categorização das amostras em dois ou três grupos. O teste identificou cerca de 145 vias com diferenças significativas. Destas, apenas uma apresenta diferença significativa entre os grupos saudável, SN lesão e SN não lesão. As demais são diferentes quando comparadas apenas amostras saudáveis contra amostras SN. Destas 145, apenas 54 apresentam significância menor que 0,05, sendo todas elas diferentes no contexto de categorização em dois grupos, reforçando o entendimento de que não há diferenças significativas entre SN lesão e SN não lesão (figura 4).

Para informações mais detalhadas, o ANEXO A contém os resultados com as descrições e as classificações resumidas das vias (chamadas de superclasses pelo banco MetaCyc).

Figura 4: Vias metabólicas diferencialmente abundantes. a) Significância ajustada de acordo com o *effect size*. b) ID do MetaCyc para *Pathways* e descrição das vias diferencialmente abundantes na mesma ordem apresentada no gráfico.



PWY-702: Biossíntese de L-metionina II	FUCCAT-PWY: Biossíntese de L-fucose I
PWY-5100: Fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato II	PYRIDOXSIN-PWY: Biossíntese de piridoxal 5'-fosfato
P41-PWY: Fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato I	P161-PWY: Degradação de acetileno
PWY-4984: Ciclo da ureia	PWY-5989: Biossíntese de ácido esteárico II
P125-PWY: biossíntese de (R,R)-butanediol	GLYOXYLATE-BYPASS: Ciclo do Glioxilato
LACTOSECAT-PWY: Degradação da lactose I	PWY-6606: Degradação de nucleotídeos guanosina II
PWY-5265: Biossíntese de peptideoglicano	PWY0-1477: Utilização de etanolamina
P42-PWY: Ciclo do ácido cítrico redutor incompleto	PWY-7242: Degradação de D-fruturonato
PANTO-PWY: Biossíntese de fosfopantotenato	PWY-7118: Deacetilação de quitina
PWY-5981: Biossíntese de CDP-diacilglicerol III	GLUTORN-PWY: Biossíntese da L-ornitina
PWY-8178: Pentose fosfato II	GLUCUROCAT-PWY: Degradação de β-D-glucoronidas
PWY-6859: Biossíntese de all-trans-farsenol	PYRIDNUCSYN-PWY: Biossíntese de novo de NAD I
ANAEROFrucAT-PWY: Fermentação homoláctea	GLYCOLYSIS-E-D: Super glicólise e da via Entner-Doudoroff
HSERMETANA-PWY: Biossíntese de L-metionina	PWY-5675: Redução de nitrato V
POLYISOPRENSYN-PWY: Biossíntese de poliisoprenoide	HEME-BIOSYNTHESIS-II-1: Biossíntese de heme b V
THISYNARA-PWY: Biossíntese de difosfato de tiamina III	P461-PWY: Fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato
PWY-6700: Biossíntese de queuosina I	PWY-6608: Degradação de nucleotídeos guanosina III
PWY-6936: Biossíntese de seleno-aminoácidos	NAGLIPASYN-PWY: Biossíntese de lipídio IVa
PWY-1861: Assimilação de formaldeído II	PWY-8073: Biossíntese de lipídio IVa
PWY-6922: Biossíntese de L-N6-acetilornitina	PWY-7761: Recuperação de NAD II
PWY-19: Biossíntese da L-cisteína	PWY0-862: Biossíntese do 5Z-dodecanoato I
PWY-5345: Super biossíntese de L-metionina	PWY-4041: Ciclo γ-glutamil
PWY0-845: Biossíntese e resgate de piridoxal 5'-fosfato	PWY-6353: Degradação de nucleotídeos purina II
PWY-6305: Super biossíntese de putrescina	PWY-7664: Biossíntese de oleato IV
PWY-6507: Degradação de 4-desoxi-L-treo-hex-4-enopiranonato	PWY-6282: Biossíntese de ácido palmítico
PWY-6803: Edição de acil fosfatidilcolina	SALVADEHYPOX-PWY: Degradação de nucleotídeos adenosina II
PWY-1269: Biossíntese de CMP-3-desoxi-alfa-D-manno-octulosonato	PWY-5028: Degradação da L-histidina II

Fonte: Imagem produzida pelo autor.

Nota-se que os grupos não apresentam quantidades muito diferentes de vias diferencialmente abundantes, cerca de 24 pertencem ao grupo SN e 30 ao grupo saudável, e a partir da quantificação das vias de acordo com o primeiro nível de classificação, que ainda é um nível bastante geral (tabela 3), observamos que há um número de vias diferencialmente abundantes aparentemente bem menor em SN do que em saudável. Além disso, pode-se observar que a soma resulta maior do que o número de vias informado. Isso acontece porque algumas vias apresentam mais de uma classificação possível. A via P461-PWY, por exemplo, uma via de fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato, apresenta 6 classificações distintas; e pode ser classificada no primeiro nível como degradação, utilização ou assimilação ou geração de energia ou metabólitos precursores. Neste caso, ela contabilizou uma vez para cada categoria. Deste modo, a tabela abaixo tenta apresentar o número de vezes que cada superclasse apareceu nos resultados, evitando superestimar o valor desconsiderando os casos em que uma mesma via apresenta mais de uma classificação, mas com mesma categoria inicial na superclasse 1.

Na tabela no Anexo B é possível conferir uma contabilização das funções atribuídas às vias diferencialmente abundantes. Nesta tabela foi feito uma contagem meticulosa de modo a não contabilizar mais de uma vez uma mesma via por conta de múltiplas classificações.

Tabela 3: Contagem de vias diferencialmente abundantes por categoria denominada “*Superclass 1*”.

Classificação	Total de vias diferencialmente abundantes	Vias mais abundantes em saudável	Vias mais abundantes em SN
Vias de biossíntese	30	17	13
Vias de degradação/utilização/assimilação	17	13	4
Vias de geração de energia e metabólitos precursores	8	4	4
Vias de glicanos	2	2	0
Vias de modificação de macromoléculas	1	0	1

Fonte: Tabela produzida pelo autor. Classificação originária do banco *MetaCyc* (CASPI et al., 2020).

Embora seja um nível bastante geral de classificação, ele nos permite ver que, por conta da atribuição de uma mesma via com mais de uma classificação, as vias

diferencialmente abundantes em saudável podem ser vias com funções mais amplas, enquanto as vias diferencialmente abundantes em SN podem ser mais restritas. Em outras palavras, pode indicar que em indivíduos SN há uma subatividade de vias metabólicas com efeitos mais abrangentes e uma maior atividade de vias com efeitos mais pontuais. Esse pode ser um elemento importante para compreender qual a relação das alterações funcionais do microbioma com a doença subjacente. A perda de vias mais amplas poderia, por exemplo, promover uma quantidade maior de efeitos secundários por impactar mais elementos da rede de interações ecológicas, o que também reforça a noção de efeitos sistêmicos e não localizados que a doença pode ter. Ou seja, não vai ser uma via específica com um produto específico que vai promover os sintomas de uma doença, mas uma rede complexa de vias e efeitos que podem ser manifestados em toda a superfície cutânea, ainda que na ausência de manifestações clínicas.

Passamos então para a investigação das categorias mais específicas das vias diferencialmente abundantes. Observamos que em relação às vias de biossíntese, há mais alterações no grupo saudável do que no SN, ou seja, há mais vias que se mostraram mais abundantes nas amostras saudáveis do que nas SN, ainda que com uma diferença não muito grande de 5 vias. Das vias de biossíntese as classificações mais relevantes são de biossíntese de lipídios e ácidos graxos, biossíntese de cofatores, carreadores e vitaminas; e biossíntese de aminoácidos (tabela 4). Observa-se que nas duas primeiras a maioria das alterações estão nas comunidades saudáveis, enquanto a maioria das alterações em vias de biossíntese de aminoácidos estão nas amostras SN .

Tabela 4: Contagem de vias diferencialmente abundantes classificadas como biossíntese. Categoria denominada “*Superclass 2*”.

Classificação	Total de vias diferencialmente abundantes	Vias mais abundantes em saudável	Vias mais abundantes em SN
Biossíntese de lipídios e ácidos graxos	8	7	1
Biossíntese de cofatores, carreadores e vitaminas	7	5	2
Biossíntese de aminoácidos	7	1	6
Biossíntese de estruturas celulares	3	2	1

Classificação	Total de vias diferencialmente abundantes	Vias mais abundantes em saudável	Vias mais abundantes em SN
Outras biossínteses	2	1	1
Biossíntese de metabólitos secundários	1	0	1
Biossíntese de tetrapirrol	1	1	0
Biossíntese de poliprenil	1	0	1
Biossíntese de amida, amidina, amina e poliamina	1	1	0
Biossíntese de carboidrato	1	1	0

Fonte: Tabela produzida pelo autor. Classificação originária do banco *MetaCyc* (CASPI et al., 2020).

Para as vias de degradação, utilização ou assimilação, observamos ainda na tabela 3 que a maior parte das vias alteradas são nas amostras saudáveis, neste caso com uma vantagem de 9 vias. Das 13 vias alteradas temos como resultados mais relevantes vias de degradação de carboidratos e de degradação de nucleotídeos e nucleosídeos, ambas categorias com a maior parte das alterações nas comunidades saudáveis (tabela 5).

Tabela 5: Contagem de vias diferencialmente abundantes classificadas como degradação, utilização ou assimilação. Categoria denominada “*Superclass 2*”.

Classificação	Total de vias diferencialment e abundantes	Vias mais abundantes em saudável	Vias mais abundantes em SN
Degradação de carboidratos	7	6	1
Degradação de nucleotídeos e nucleosídeos	4	4	0
Degradação de ácido carboxílico	2	2	0
Metabolismo de nutrientes inorgânicos	2	1	1
Utilização e assimilação de compostos C1	2	0	2
Degradação de amida, amidina, amina e poliamina	1	1	0

Classificação	Total de vias diferencialment e abundantes	Vias mais abundantes em saudável	Vias mais abundantes em SN
Degradação de aminoácidos	1	1	0
Degradação de compostos poliméricos	1	1	0
Degradação de álcoois	1	1	0

Fonte: Tabela produzida pelo autor. Classificação originária do banco *MetaCyc* (CASPI et al., 2020).

Em relação às vias de geração de energia e metabólitos precursores, as alterações estão mais bem distribuídas, tendo 4 vias alteradas em cada grupo de comunidades. A maioria dessas vias são de fermentação. Apenas três escapam desta classificação: uma é uma via da pentose fosfato (PWY-8178) e duas não apresentam classificação além da superclasse 1, sendo uma delas (GLYOXYLATE-BYPASS), definida como Ciclo do Glioxilato e a outra (GLYCOLYSIS-E-D), definida como supervia da glicólise e da via Entner-Doudoroff. Em relação, portanto, às vias de fermentação temos uma distribuição mais equilibrada de alterações nas vias entre as amostras dos grupos saudável e SN (tabela 6)

Tabela 6: Contagem de vias diferencialmente abundantes classificadas como fermentação. Categoria denominada “*Superclass 3*”.

Classificação	Total de vias diferencialmente abundantes	Vias mais abundantes em saudável	Vias mais abundantes em SN
Fermentação para ácidos graxos de cadeia curta	5	2	3
Fermentação de piruvato	4	2	2
Fermentação para álcoois	2	2	0

Fonte: Tabela produzida pelo autor. Classificação originária do banco *MetaCyc* (CASPI et al., 2020).

Por fim, em relação às classes de vias menos frequentes, as vias de glicanos e vias de modificação de macromoléculas, as duas primeiras são vias de biossíntese de lipopolissacarídeos que estão mais abundantes em saudáveis, e a segunda é uma via de biossíntese de queuosina, um nucleosídeo modificado presente em algumas bactérias e eucariotos, alterada em SN.

De modo geral, a análise destes resultados nos mostra que as vias que estão mais abundantes nas comunidades saudáveis tendem a se agrupar em torno de poucas categorias, sendo as principais identificadas: vias de biossíntese de lipídios e ácidos graxos, vias de biossíntese de cofatores, carreadores e vitaminas; e vias de degradação de carboidratos. Já as vias mais abundantes nas comunidades SN não revelam o mesmo padrão, ocupando classificações diversas, com exceção de uma única categoria que se destacou, as vias de biossíntese de aminoácidos.

A observação desses agrupamentos de classificações, no entanto, não traz uma informação que possa ser associada de forma causal com os fenótipos que estão sendo considerados. Isto é, uma alteração na abundância de uma via de degradação de L-histidina, por exemplo, não indica que isso possa ter uma relação causal com o fenótipo saudável das comunidades testadas. É preciso, portanto, que os resultados sejam interpretados à luz desta limitação.

Assim, uma vez contemplados dois de nossos objetivos, quais sejam, a identificação de agrupamentos e biomarcadores com relevância estatística para diferenciação das amostras de indivíduos saudáveis e SN, prosseguimos investigando as vias diferencialmente abundantes entre os grupos, de modo a compreender seus possíveis significados para nos contextos observados e suas possíveis contribuições para a compreensão dos fenômenos de disbioses cutâneas.

6.3 Alterações em vias metabólicas relacionadas a lipídios

Temos um interesse especial em vias associadas à produção, transformação ou consumo de lipídios nas comunidades microbianas, uma vez que essa classe de moléculas parece ter um papel seletivo fundamental na colonização e manutenção das comunidades cutâneas, e, portanto, alterações na disponibilidade dessas moléculas poderiam ser um fator importante para aparecimento de disbioses. Nesse sentido, chama atenção que uma das principais categorias de vias diferencialmente abundantes identificadas tenha sido biossíntese de lipídios e ácidos graxos em indivíduos saudáveis. Isso pode sugerir que uma das características de uma comunidade disbiótica associada à SN seja uma redução na produção de lipídios e ácidos graxos pelos membros do microbioma cutâneo.

Para aprofundar nesta questão, separamos as vias categorizadas na definição acima para apresentar suas funções mais especificamente (tabela 7)

Tabela 7: Detalhamento das vias metabólicas diferencialmente abundantes classificadas com biossíntese de lipídios e ácidos graxos.

ID da via	Condição Clínica*	Coef Ajustado	Descrição
PWY-6282	Saudável	-7,031	Via de biossíntese de ácido palmitoleico
PWY-7664	Saudável	-6,816	Via de biossíntese de oleato IV
PWY0-862	Saudável	-6,210	Via de biossíntese do 5Z-dodecanoato I
NAGLIPASYN -PWY (2)	Saudável	-5,401	Via de biossíntese de lipídio IVa
PWY-8073 (2)	Saudável	-5,401	Via de biossíntese de lipídio IVa
PWY-5989	Saudável	-3,804	Via de biossíntese de ácido esteárico II
PWY-6803	Saudável	-3,460	Via de edição de acil fosfatidilcolina
PWY-5981	SN	4,454	Via da biossíntese de CDP-diacilglicerol III

Fonte: Tabela produzida pelo autor.

* Condição clínica em que a via está mais abundante

Observa-se que as vias na tabela 7 são de biossínteses de um conjunto pequeno de moléculas específicas que podem ser investigadas em busca da sua possível relação com manifestações clínicas cutâneas. As abundâncias relativas de cada via podem ser conferidas no ANEXO C. Antes disso, uma análise das informações sobre estas vias disponíveis no MetaCyc revelam que cerca de seis delas estão altamente interconectadas e são derivadas de uma via central, a via de biossíntese de palmitato II. A figura 5 mostra os pontos de derivação desta via central para as outras e os principais produtos e subprodutos.

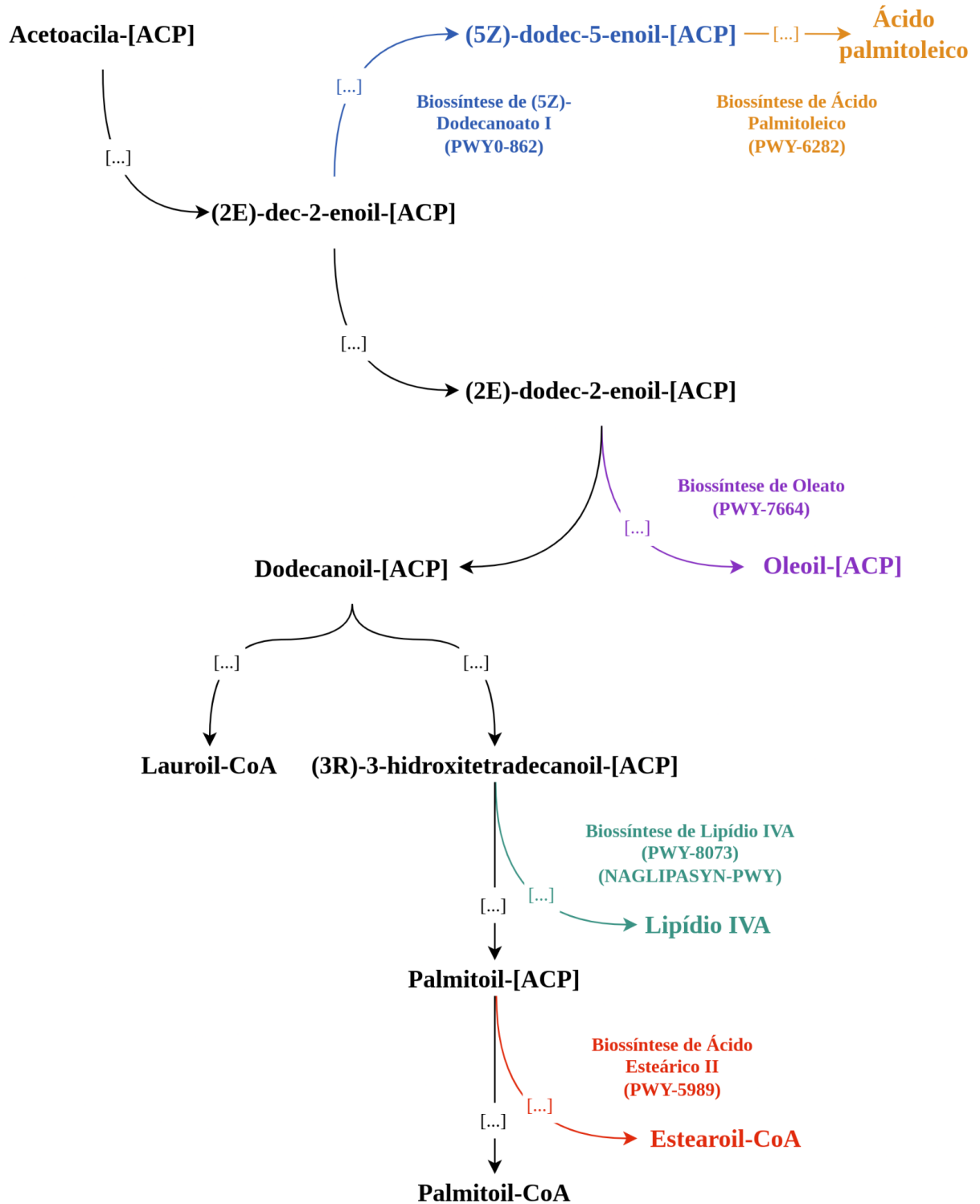
De certo, a existência dessa relação entre algumas das vias diferencialmente abundantes se dá pela presença de enzimas comuns entre elas, cujas abundâncias foram utilizadas para o cálculo de abundância das vias. Isto pode ser verificado com o exame das

enzimas presentes em cada reação e seus respectivos genes, uma informação presente no banco MetaCyc na página de cada via. Notamos, com isso, que as vias de biossíntese do (5Z)-dodecanoato I e a via de biossíntese do ácido palmitoleico compartilham 4 enzimas que também estão presentes na via de biossíntese do palmitato II; e a via de biossíntese do ácido esteárico II, por sua vez, compartilha 6 enzimas com a via de biossíntese do palmitato II (tabela 8).

Segundo informações do banco, nenhuma outra enzima presente nas reações das vias da figura 5 aparece em mais de uma via metabólica destas apresentadas. De tal modo, um aumento na abundância relativa de um conjunto pequeno de genes não é suficiente para explicar esta variação na abundância das vias metabólicas. A via de biossíntese do oleato II, por exemplo, não apresenta enzima comum com nenhuma outra via diferencialmente abundante da mesma classe, o que acrescenta mais alguns genes ao conjunto com expressão aumentada.

De modo geral, portanto, este resultado enfatiza a importância que genes cuja enzimas atuam no metabolismo de lipídios podem ter para a pesquisa de disbioses cutâneas. Novamente, porque um aumento significativo de um conjunto de reações interconectadas é indicativo de um efeito sistêmico que pode estar sendo perdido na comunidade que reside na pele de um indivíduo com SN.

Figura 5: Visão geral da via de biossíntese de palmitato II (PWY-5971), mostrando sua conexão com cinco das vias diferencialmente abundantes (indicadas em cores). A via de biossíntese do ácido palmitoleico, por sua vez, é derivada da via de biossíntese do (5Z)-dodecanoato I. Os nomes de metabólitos e vias são derivados do MetaCyc e foram traduzidos livremente.



Fonte: Imagem produzida pelo autor.

Tabela 8: Genes comuns a mais de uma via diferencialmente abundante.

Gene	Código de acesso do UniProt	Enzima	Número EC	Vias em que o gene está presente
fabG	P0AEK2	3-oxoacil-[ACP] redutase	1.1.1.100	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de (5Z)-Dodecanoato I Biossíntese de Ácido Palmitoleico
fabZ	P0A6Q6	3-hidroxiacil-[ACP] desidratase	4.2.1.59	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de (5Z)-Dodecanoato I Biossíntese de Ácido Palmitoleico
fabI	P0AEK4	Enoil-[ACP] redutase	1.3.1.9	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de (5Z)-Dodecanoato I Biossíntese de Ácido Palmitoleico
fabB	P0A953	3-oxoacil-[ACP] sintase 1	2.3.1.41	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de (5Z)-Dodecanoato I Biossíntese de Ácido Palmitoleico
AT1G24360	P33207	3-oxoacil-[ACP] redutase	1.1.1.100	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de Ácido Esteárico II
enrA1	Q93X66	Enoil-[ACP] redutase	1.3.1.9	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de Ácido Esteárico II
FATB	Q9SJE2	Palmitoil-[ACP] tioesterase	3.1.2.21	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de Ácido Esteárico II
KAS1	P52410	3-oxoacil-[ACP] sintase I	2.3.1.41	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de Ácido Esteárico II
LACS9	Q9CAP8	Cadeia longa acil-CoA sintetase 9	6.2.1.3	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de Ácido Esteárico II
FATA	Q42561	Oleoil-[ACP] tioesterase 1	3.1.2.14	Biossíntese de Palmitato II Biossíntese de Ácido Esteárico II

Fonte: Tabela produzida pelo autor.

6.4 Sobre as vias com mais de uma classificação

Na seção 5.2 afirmamos que, como algumas vias apresentam mais de uma classificação possível, e como por conta disso na contagem geral na tabela 3 parece que há mais vias mais abundantes em saudável do que a figura 4 mostra, poderia ser formulada hipótese de que as vias diferencialmente abundantes em saudável podem ser vias com funções mais amplas, enquanto as vias diferencialmente abundantes em SN podem ser mais restritas. Nesta seção vamos investigar estas vias e avaliar a validade desta hipótese.

Foram encontradas 15 vias diferencialmente abundantes com múltiplas classificações no banco, cujas categorias variam bastante, incluindo vias de biossíntese de lipídios, cofatores, carreadores e vitaminas, fermentação e degradação de carboidratos. De modo geral, a investigação dessas vias, seus produtos e substratos não parece apoiar a ideia de que elas são vias com funções amplas. Isto é, a existência de classificações diferentes não se dá por conta da presença de mais de uma função dentro de uma mesma via, como pensávamos que isso sugeria. As únicas vias que poderiam ser enquadradas nesta hipótese são P461-PWY (via de fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato), diferencialmente abundante em saudáveis, P41-PWY (via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato I) e PWY-5100 (via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato II), diferencialmente abundantes em SN. Estas vias produzem diferentes produtos a partir da fermentação de piruvato, dependendo de condições regulatórias, e, por isso, acabam sendo classificadas em mais de uma categoria.

As demais vias apenas parecem apresentar uma multiplicidade de classificações por conta de redundâncias nas categorias que o banco apresenta, ou por conta de incongruências de definições para determinadas moléculas. As vias PYRIDOXYN-PWY e PWY0-845 são duas vias de biossíntese de 5'-fosfato de piridoxal, a forma ativa da vitamina B₆. A primeira é uma variação da via de biossíntese propriamente dita, e a segunda é uma supervia que compreende tanto a biossíntese como uma via de reciclagem que produz a molécula a partir de substratos obtidos no ambiente. Neste caso, ambas as vias são classificadas como biossíntese de vitamina B₆ no último nível, mas em um nível anterior a classificação pode ser como biossíntese de cofatores enzimáticos, ou biossíntese de vitaminas, resultando em duas classificações com essa única distinção.

Em outros casos temos uma mesma via podendo ser classificada como degradação de carboidratos, degradação de ácidos carboxílicos ou degradação de compostos poliméricos. Nas vias de fermentação de piruvato podemos encontrar também estes problemas. A

fermentação de piruvato a acetato pode ser classificada como fermentação de piruvato ou como fermentação para AGCC. Portanto, essas classificações múltiplas revelam muito mais um problema organizacional do banco do que um achado científico da pesquisa. De todo modo, esta percepção tem também um valor em si, pois uma boa curadoria das bases de dados é essencial para pesquisas como esta, que se baseiam na análise de quantidades de dados suficientes para dificultar etapas manuais como classificação, obtenção das listas de genes das vias, mapeamento de interconexões entre diferentes vias, entre outros.

De modo geral, as vias com alterações significativas compreendem funções básicas e comuns em todo organismo vivo, como biossíntese e processamento de macromoléculas e micronutrientes. Isto, novamente, reforça o caráter complexo e sistêmico das alterações detectadas por meio destes dados.

O exame mais aprofundado que fizemos no banco das 15 vias com múltiplas classificações citadas na seção anterior, por exemplo, não aponta nenhuma função em especial que pareça estar consistentemente alterada. As vias que investigamos compreendem funções básicas principalmente do metabolismo energético, como produção e reciclagem de NAD (PWY-7761 e PYRIDNUCSYN-PWY), processamento de carboidratos (GLUCUROCAT-PWY, PWY-7242 e PWY-7118) e biossíntese de outros cofatores enzimáticos como vitamina B₆, heme *b* e vitamina B₁ (PYRIDOXSIN-PWY, PWY0-845, HEME-BIOSYNTHESIS-II-1 e THISYNARA-PWY respectivamente, apenas a última com a abundância diferencial em SN).

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho, fizemos uma análise funcional do microbioma de indivíduos portadores de SN a partir de dados de metagenômica completa. Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho com essa abordagem aplicada à SN. Foram utilizadas ferramentas que geralmente são empregadas para análises ecológicas de estruturas de comunidades. Com isso, conseguimos mostrar que a partir da abundância de vias metabólicas não estratificadas podemos diferenciar significativamente as amostras de indivíduos saudáveis das amostras de indivíduos com SN. Mostramos ainda que não foi possível diferenciar internamente o grupo das amostras de SN entre aquelas de regiões com lesão para as regiões sem lesão.

Indivíduos recém nascidos portadores da SN apresentam um fenótipo generalizado da doença. Adultos, diferentemente, apresentam ruptura da barreira epidérmica em locais

específicos da pele. Em função disso, os autores do trabalho que deu origem aos dados analisados aqui discutem que o microbioma cutâneo local poderia contribuir para esta característica das lesões da SN em adultos (WILLIAMS et al., 2020). No entanto, os autores mostraram que apenas nos ensaios de cultivo é possível eleger diferenças significativas entre SN com lesão e sem lesão. A saber, a contagem total de colônias revelou uma abundância absoluta de espécies de *Staphylococcus*, em especial *S. aureus*, mais elevada nas regiões da pele com lesão do que nas regiões sem lesão ou em indivíduos saudáveis. Ademais, a composição taxonômica das comunidades dos indivíduos SN não apresenta diferenças em relação às regiões lesionadas ou não.

O mapeamento de vias metabólicas em estudos de microbioma a partir de dados de metagenômica é uma estratégia que vem sendo utilizada há alguns anos. A partir desta mesma metodologia já foi demonstrado que as abundâncias relativas de vias metabólicas em comunidades microbianas humanas são muito mais estáveis e uniformemente diversas do que as abundâncias relativas dos táxons. Tal observação contribui para o entendimento das vias metabólicas como uma propriedade ecológica de todo o microbioma humano (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012; TURNBAUGH et al., 2009). Em contraste com o que geralmente se observa para a estrutura taxonômica das comunidades, diversas vias metabólicas estão igualmente presentes em diferentes indivíduos e regiões do corpo, enquanto poucas vias têm grande variação entre indivíduos para uma mesma região. Vias com alta variabilidade também tendem a ser as de baixa abundância, o que pode indicar tratar-se de funções específicas de nicho, mas também é um indício da presença de funções metabólicas não caracterizadas e, portanto, não detectáveis pelo método (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012).

Embora trabalhos na área de microbiomas humanos vêm incluindo análises funcionais em suas metodologias, são menos comuns os casos em que elas são o principal elemento do trabalho (SCHOMMER; GALLO, 2013). Além disso, as metodologias geralmente se destinam unicamente a identificar as vias diferencialmente abundantes. Estudos com microbioma intestinal a partir de amostras de fezes mostram que em indivíduos com psoríase pode-se encontrar vias metabólicas significativamente aumentadas ou diminuídas. A saber, vias de secreção de bactérias, biossíntese de lipopolissacarídeos, metabolismo de açúcares e aminoácidos ocorrem em maior abundância, enquanto vias de transportadores ABC, meiose de leveduras e apoptose aparecem com abundância diminuída (SHAPIRO et al., 2019; WANG et al., 2022; XIAO et al., 2021). Também em pacientes de psoríase, genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo e transporte de carboidratos foram encontradas

aumentadas em amostras de fezes, enquanto enzimas associadas ao metabolismo energético foram encontradas diminuídas em relação aos controles saudáveis. (CHEN et al., 2018).

No contexto cutâneo, vias associadas ao metabolismo de aminoácidos e lipídios, metabolismo energético, e vias de replicação e reparo de DNA foram identificadas como aumentadas em amostras de pele de pacientes de DA; enquanto vias de biossíntese de lipídios, hormônios esteróides, regulação de citoesqueleto e metabolismo xenobiótico se mostraram diminuídas em relação aos controles saudáveis (RAMADAN et al., 2019). Alterações funcionais no microbioma também são detectadas em contextos onde não há doença, mas flutuações cíclicas normais na produção hormonal, como no caso do ciclo menstrual em mulheres cisgênero. Em um estudo com 18 participantes cuja pele do rosto é propensa à acne, foi observado um aumento na comunidade microbiana da expressão de vias de biossíntese heme a partir da glicina durante a fase folicular do ciclo, na qual há uma predominância do hormônio estrogênio, o que poderia aumentar a presença de metabólitos pró-oxidativos na pele (HRAPOVIC et al., 2022). Além disso, o estudo comparou as características funcionais do microbioma das participantes de origem caucasiana com as de origem chinesa e mostrou que diversas vias metabólicas estavam com expressão reduzida na pele das últimas, incluindo vias da pentose fosfato, ciclo do ácido cítrico, degradação de alantoína, biossíntese de glicogênio; em sua maioria, vias associadas com balanceamento redox. Para os autores, tal resultado é uma evidência de que na fase folicular do ciclo há um estresse oxidativo potencialmente maior na pele de mulheres cisgênero chinesas do que nas de origem caucasiana (HRAPOVIC et al., 2022).

De fato, a literatura tem indicado que a estrutura taxonômica das comunidades microbianas não é suficiente para compreender suas funções. É necessário também descrever e investigar as funções metabólicas das comunidades, produtos e subprodutos do metabolismo microbiano e do hospedeiro, sinais exógenos decorrentes da dieta, drogas e outros estilos de vida do hospedeiro e estímulos ambientais. Nossos resultados, por sua vez, reforçam o entendimento das vias metabólicas como uma propriedade verdadeiramente ecológica dos microbiomas.

No trabalho original que produziu os dados analisados nesta monografia, os autores sugerem a hipótese de uma participação crucial de proteases nos sintomas cutâneos da doença, incluindo proteases especificamente bacterianas como *scpA* e *scpB*, ou a indução de produção de proteases humanas por fatores bacterianos como o PSM α (WILLIAMS et al., 2020). Para Williams e colaboradores, portanto, o aparecimento de lesões poderia ser facilitado por alterações locais no microbioma cutâneo que resultariam em maior produção de

moléculas associadas ao agravamento dos sintomas da SN. Neste sentido, uma vez que nossas análises mostraram que não é possível separar as amostras de lesão das de não lesão nos indivíduos com SN a partir das vias metabólicas, entendemos que isso revela como diferenças significativas na estrutura e função das comunidade microbianas nestes indivíduos não são alterações locais, mas sistêmicas. Tais mudanças devem ser efeito de diferentes pressões seletivas que são impostas ao ambiente cutâneo por variações biológicas do hospedeiro e também do ambiente que este ocupa. No caso da SN, por exemplo, podemos afirmar que se trata de uma pele com intensa descamação do estrato córneo, desestruturação da barreira epidérmica e aumento de proteases na epiderme.

No entanto, devemos também dar um destaque apropriado ao método utilizado. Talvez diferenças importantes no microbioma da pele com lesão para a sem lesão não sejam detectáveis no nível que investigamos. Uma vez que as disbioses vem sendo entendidas como condições sistêmicas, de fato, é de se esperar que alterações ocorram em diferentes níveis. Os autores do estudo original, por exemplo, mostraram que era possível encontrar mRNA aumentado de determinadas proteases nas amostras de lesão que não estavam presentes nas amostras sem lesão (WILLIAMS et al., 2020). Tais diferenças não poderiam ser detectadas a partir da nossa metodologia, que focou em analisar a presença de DNA de determinados genes e contabilizar as vias metabólicas completas formadas pelas enzimas encontradas. Além disso, é importante ressaltar que nossa análise foi realizada em cima dos resultados obtidos para as comunidades como um todo, o que não garante que as vias metabólicas identificadas estejam de fato presentes nos organismos.

Nesse sentido, entendemos que a combinação e integração de estudos em diferentes níveis é uma necessidade para elucidação de fenômenos microecológicos como as interações entre microbioma e hospedeiro. Por meio da combinação de resultados de metagenômica com resultados de metabolômica, por exemplo, é possível identificar se as vias metabólicas alteradas são confirmadas pelo aumento de seus metabólitos, como feito em estudo de Chen e colaboradores que mostrou separação significativa dos perfis de metabólitos de pacientes de psoríase em comparação com o controle saudável, além do aumento de metabólitos específicos do microbioma e correlação da alteração na estruturas das comunidades com alteração nos metabólitos séricos (CHEN et al., 2021).

A exploração de diferentes níveis, como de transcritos, proteínas e metabólitos, é fundamental para interpretação do sentido biológico de mudanças detectadas em estudos como este que realizamos, uma vez que, dentro da nossa metodologia, não é possível fazer afirmações acerca das causas e efeitos das alterações detectadas. Ainda assim, além de

evidenciar que vias metabólicas presentes na comunidade cutânea de indivíduos saudáveis são significativamente diferentes das presentes em indivíduos com SN, demonstramos que dentre as principais vias responsáveis por gerar essa diferenciação, há um conjunto de vias de metabolismo de lipídios, sabidamente moléculas de relevância para a saúde da pele.

Dentre as vias de biossíntese de lipídios e ácidos graxos diferencialmente abundantes em saudáveis, destacamos o ácido palmitoléico, um ácido graxo ômega-7 insaturado comumente encontrado na pele humana principalmente em indivíduos mais jovens. Seus efeitos têm sido investigados quanto à possível importância na manutenção da epiderme e proteção contra patógenos. Cosméticos contendo tal molécula já são desenvolvidos e comercializados em formulações como cremes para pele a partir do óleo de macadâmia e outros óleos vegetais ou de leveduras (KOLOUCHOVÁ et al., 2015). Em nível de pesquisa, a aplicação tópica de ácido palmitoléico em feridas induzidas em camundongos produziu aumento significativo na velocidade de cura dessas feridas em relação ao grupo controle. O mecanismo proposto pelos autores foi uma atividade anti-inflamatória do lipídio por meio da inibição da migração de neutrófilos estimulada por lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias gram-negativas (WEIMANN et al., 2018).

O efeito do ácido palmitoleico sobre a proliferação de bactérias gram-positivas também tem sido investigado há algumas décadas. No início dos anos 90 foi observado que o metronidazol, fármaco utilizado para o tratamento de diversos tipos de infecções parasitárias e bacterianas, incluindo enfermidades cutâneas como acne e rosácea; em sinergia com o ácido palmitoleico inibe o crescimento *in vitro* de *C. acnes* e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (AKAMATSU et al., 1990). Mais tarde, o mesmo efeito foi visto para inibição do crescimento de outras espécies como *S. aureus*, *S. salivarius* e *Fusobacterium nucleatum* (WILLE; KYDONIEUS, 2003).

Para além disso, em um estudo clínico a suplementação oral de ácido palmitoléico em indivíduos de 30 a 60 anos com marcas avançadas de envelhecimento cutâneo provocou diminuição significativa na perda transepidermica de água e aumento nos níveis de hidratação da pele, além de possivelmente aumentar sua elasticidade, um efeito observado, mas que não demonstrou significância estatística no teste (KOH et al., 2023). Os autores defendem que a suplementação é segura e potencialmente pode aumentar a qualidade de vida dos indivíduos.

A presença de uma produção mais acentuada de ácido palmitoleico pode ser, portanto, um possível biomarcador de saúde da pele em função de um mecanismo de controle populacional de determinadas espécies, como *S. aureus*. Linhagens desta espécie provenientes

de lesões dos pacientes de SN, ao serem aplicadas nas costas de roedores, resultaram no aparecimento de lesões similares àquelas características da doença (WILLIAMS et al., 2020).

Outros ácidos graxos insaturados com vias de biossíntese aumentada nas amostras saudáveis foram o ácido esteárico e o ácido oléico. Ambos são componentes comuns em produtos de cuidado para a pele (*skin care*) como ingredientes emulsificantes, e são também explorados para sistemas de administração de fármacos de uso tópico por conta do seu poder de penetração nas camadas da epiderme (MUKHERJEE et al., 2010; NOOR et al., 2022; YAMAMOTO et al., 2015). Seus efeitos diretos para a pele, porém, ainda são dúbios. Sais de cálcio dos ácidos esteárico, oleico e linoleico já demonstraram um efeito inibitório sobre bactérias gram-positivas que aumenta quanto maior a insaturação dos ácidos, tal que o ácido linoleico, o mais insaturado dos três, produziu inibição de *C. acnes*, *S. aureus* e *S. epidermidis*; enquanto apenas a primeira espécie foi inibida pelo ácido oleico (YAMAMOTO et al., 2015). Ademais, ácido oleico e linoleico liberados por *Corynebacterium accolens* a partir da trioleína inibiram o crescimento de *S. pneumoniae* em estudos de cultivo (BOMAR et al., 2016).

No entanto, o ácido oleico também foi correlacionado com a presença de eritemas (manchas vermelhas na pele) no rosto de indivíduos saudáveis de origem japonesa, possivelmente por meio da indução de um aumento na razão dos indicadores inflamatórios IL-36 γ /IL-37. Esses indicadores também são encontrados aumentados no estrato córneo em uma variedade de condições inflamatórias cutâneas como DA, psoríase e em queimaduras por sol (KAWAMOTO et al., 2023). Também foi identificado um enriquecimento em vias de biossíntese de ácido esteárico e oleico em amostras de fezes de camundongos modelos de psoríase, além da verificação de agravamento dos sintomas nos camundongos após suplementação com estes ácidos (ZHAO et al., 2023). Um possível mecanismo atribuído ao ácido oleico como pró-inflamatório é a ativação e polarização específicas de macrófagos, aumentando o potencial de resposta dessas células à presença de *C. acnes*, promovendo maior produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , mas reduzindo a secreção de TNF- α e IL-6; enquanto o ácido esteárico mostrou indução de aumento de IL-1 β e, por sua vez, também aumento de TNF- α (LOVÁSZI et al., 2017).

Para além disso, AGCC como acetato, butirato, formato, propionato, têm sido investigados como importantes integrantes do microbioma intestinal e cutâneo (BASSON; WIJEYESEKERA, 2017). Revisões recentes mostram que os AGCC são comumente produzidos por integrantes dos microbiomas humanos e podem estar associados com manutenção da barreira epidérmica e diminuição de processos inflamatórios (XIAO et al.,

2022; XIONG et al., 2022). A presença de propionato, por exemplo, pode estar significativamente associada de forma positiva com maior umidade da pele (PARK et al., 2021), além de possuir propriedades antimicrobianas junto do butirato (AUGENLICHT et al., 2003; YUN; LEE, 2016). Em nossas análises, encontramos diferentes vias de fermentação para AGCC com aumento relativo tanto em amostras saudáveis quanto em amostras de SN, sendo que em saudáveis vimos abundância diferencial da fermentação de hexitol, e em SN na de piruvato.

Em conclusão, a literatura científica aponta que as alterações detectadas em nosso estudo podem ter sentido biológico relevante para o entendimento dos efeitos da SN sobre o microbioma e vice-versa. No entanto, não são esperadas associações diretas e simples. A presença de determinadas moléculas resultantes do metabolismo microbiano parecem poder tanto contribuir para saúde quanto para aumento de sintomas inflamatórios. Seus efeitos, portanto, podem estar sob uma fina regulação ecológica que mantém um determinado equilíbrio na comunidade. A elucidação dos mecanismos e componentes que sustentam este equilíbrio requer uma compreensão sistêmica dos processos, e não de apenas um pequeno conjunto de itens que o compõem.

8 CONCLUSÕES

Neste trabalho, tivemos como objetivo comparar as vias metabólicas presentes em comunidades microbianas cutâneas em pacientes da SN em comparação com pessoas saudáveis. Nossos propósitos foram explorar se diferenças poderiam ser identificadas e utilizadas para classificar as amostras com suporte estatístico, mapear vias com abundância diferencial e investigar os possíveis significados e importância dessas alterações.

Conseguimos determinar o perfil funcional das comunidades analisadas e mostrar que o conjunto de abundância relativa das vias metabólicas não estratificadas permite uma separação das amostras em dois grupos, saudável e SN, com significância estatística. Com isso, concluímos que o estado de saúde afeta o perfil funcional do microbioma cutâneo. Mostramos ainda que não há diferença significativa entre as amostras de áreas com lesão e sem lesão nos indivíduos portadores da SN. Tal resultado aponta para uma variação de caráter sistêmico no microbioma de portadores da SN, não sendo possível atribuir o aparecimento de lesões a alterações na presença ou ausência de determinadas vias metabólicas. Possíveis diferenças entre áreas com e sem lesões deveriam ser investigadas em outros níveis e integradas aos nossos resultados, de modo a avançar com a compreensão do fenômeno.

Identificamos um conjunto amplo de vias metabólicas diferencialmente abundantes entre saudáveis e SN, mostrando a possibilidade de se eleger biomarcadores para pele saudável e afetada pela SN. Mostramos, por exemplo, que indivíduos saudáveis apresentam vias de biossíntese e lipídios mais abundantes, enquanto indivíduos com SN se destacam pelas vias de biossíntese de aminoácidos. Também a degradação de carboidratos foi uma categoria com vias diferencialmente abundantes em saudável, mas não em SN, o que vale ser discutido e melhor explorado, uma vez que a produção de energia por meio da degradação de carboidratos é uma função central em qualquer organismo. Esses resultados, no entanto, não permitem fazer correlações causais com a manifestação ou aumento dos sintomas clínicos. Tal limitação é inerente ao método, cuja pretensão foi de promover uma análise exploratória e formular hipóteses que possam ser investigadas mais a fundo em outros trabalhos.

A partir de um olhar mais direcionado, exploramos na discussão os possíveis significados biológicos do aumento de vias de biossíntese de lipídios. Mostramos que, ainda que determinados lipídios possam ser correlacionados com maior saúde da pele, há também evidências que apontam para uma certa dubiedade nesta questão. Assim, hipotetizamos que deve haver um equilíbrio fino nos níveis de diferentes lipídios produzidos pelo microbioma que atuam na regulação da abundância de determinados táxons, e na produção de moléculas pró e anti-inflamatórias. Tal equilíbrio deve ser resultado de uma complexa rede de interações ecológicas.

Como passos seguintes, estudos em nível de transcritos e metabólitos poderiam acessar melhor as possíveis diferenças entre a pele lesionada e a não lesionada nos indivíduos com SN. Também seriam de interesse para acessar diretamente a presença dos metabólitos derivados das vias metabólicas alteradas.

Além disso, reiteramos que estes resultados carecem de uma investigação mais aprofundada do conjunto de reações e genes identificados. É preciso confirmar a presença destes genes nas amostras, sua presença e expressão em organismos que residem na pele humana. Para além disso, conhecer a história evolutiva desses genes também seria de grande valia para compreender quais razões poderiam levar a sua ausência em determinadas espécies e linhagens, a que pressões seletivas eles podem estar sujeitos e como a pele saudável *versus* doente atuam como ambiente para eles.

REFERÊNCIAS

- ABISADO, R. G. et al. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*, v. 9, n. 3, 5 jul. 2018.
- AKAMATSU, H. et al. The inhibition of free radical generation by human neutrophils through the synergistic effects of metronidazole with palmitoleic acid: a possible mechanism of action of metronidazole in rosacea and acne. *Archives of Dermatological Research*, v. 282, n. 7, p. 449–454, 1990.
- ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance: NON-PARAMETRIC MANOVA FOR ECOLOGY. *Austral Ecology*, v. 26, n. 1, p. 32–46, fev. 2001.
- ANDERSON, M. J.; WALSH, D. C. I. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? *Ecological Monographs*, v. 83, n. 4, p. 557–574, nov. 2013.
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. , 2019. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>
- AUGENLICHT, L. et al. Repression of MUC2 gene expression by butyrate, a physiological regulator of intestinal cell maturation. *Oncogene*, v. 22, n. 32, p. 4983–4992, 7 ago. 2003.
- BARBAROT, S. et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. *Allergy*, v. 73, n. 6, p. 1284–1293, jun. 2018.
- BASSON, A. R.; WIJEYESEKERA, A. Metabolic phenotyping for understanding the gut microbiome and host metabolic interplay. *Emerging Topics in Life Sciences*, v. 1, n. 4, p. 325–332, 30 nov. 2017.
- BAURECHT, H. et al. Epidermal lipid composition, barrier integrity, and eczematous inflammation are associated with skin microbiome configuration. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 141, n. 5, p. 1668- 1676.e16, maio 2018.
- BEGHINI, F. et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. *eLife*, v. 10, p. e65088, 4 maio 2021.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121–141, mar. 2014.
- BERG, G. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, v. 8, n. 1, p. 103, dez. 2020.

- BITOUN, E. LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Human Molecular Genetics*, v. 12, n. 19, p. 2417–2430, 5 ago. 2003.
- BOMAR, L. et al. *Corynebacterium accolens* Releases Antipneumococcal Free Fatty Acids from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols. *mBio*, v. 7, n. 1, 2 mar. 2016.
- BRIOT, A. et al. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 5, p. 1135–1147, 11 maio 2009.
- BRÜGGEMANN, H. et al. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science (New York, N.Y.)*, v. 305, n. 5684, p. 671–673, 30 jul. 2004.
- BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 16, n. 3, p. 143–155, mar. 2018.
- BYRD, A. L.; SEGRE, J. A. Adapting Koch's postulates. *Science*, v. 351, n. 6270, p. 224–226, 15 jan. 2016.
- CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. D1, p. D445–D453, 8 jan. 2020.
- CHAVANAS, S. et al. Mutations in *SPINK5*, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nature Genetics*, v. 25, n. 2, p. 141–142, jun. 2000.
- CHEN, D. et al. Microbiome and Metabolome Analyses Reveal Novel Interplay Between the Skin Microbiota and Plasma Metabolites in Psoriasis. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 643449, 2021.
- CHEN, Y. E.; FISCHBACH, M. A.; BELKAID, Y. Skin microbiota–host interactions. *Nature*, v. 553, n. 7689, p. 427–436, 25 jan. 2018.
- CHEN, Y.-J. et al. Intestinal microbiota profiling and predicted metabolic dysregulation in psoriasis patients. *Experimental Dermatology*, v. 27, n. 12, p. 1336–1343, dez. 2018.
- CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 13, n. 4, p. 260–270, abr. 2012.
- COGEN, A. L. et al. Selective Antimicrobial Action Is Provided by Phenol-Soluble Modulins Derived from *Staphylococcus epidermidis*, a Normal Resident of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 130, n. 1, p. 192–200, jan. 2010.
- COSTELLO, E. K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science (New York, N.Y.)*, v. 326, n. 5960, p. 1694–1697, 18 dez. 2009.

- COYTE, K. Z.; RAKOFF-NAHOUM, S. Understanding Competition and Cooperation within the Mammalian Gut Microbiome. *Current Biology*, v. 29, n. 11, p. R538–R544, jun. 2019.
- CRESCI, G. A.; BAWDEN, E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 30, n. 6, p. 734–746, dez. 2015.
- DESCARGUES, P. et al. Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nature Genetics*, v. 37, n. 1, p. 56–65, jan. 2005.
- DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 46, n. 1, p. 77–89, mar. 2017.
- EWELS, P.; DUNCAN, A.; YATES, J. A. F. SRA-Explorer. , 2023. Disponível em: <<https://sra-explorer.info>>
- GILBERT, J. A.; LYNCH, S. V. Community ecology as a framework for human microbiome research. *Nature Medicine*, v. 25, n. 6, p. 884–889, jun. 2019.
- GOYAL, A. et al. Ecology-guided prediction of cross-feeding interactions in the human gut microbiome. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 1335, dez. 2021.
- GRIBBON, E. M.; CUNLIFFE, W. J.; HOLLAND, K. T. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *Journal of General Microbiology*, v. 139, n. 8, p. 1745–1751, ago. 1993.
- HAUSSER, I.; ANTON-LAMPRECHT, I. Severe Congenital Generalized Exfoliative Erythroderma in Newborns and Infants: A Possible Sign of Netherton Syndrome. *Pediatric Dermatology*, v. 13, n. 3, p. 183–199, maio 1996.
- HRAPOVIC, N. et al. Clinical and metagenomic profiling of hormonal acne-prone skin in different populations. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 21, n. 11, p. 6233–6242, nov. 2022.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 13 jun. 2012.
- JIA, Y. et al. The mechanism of skin lipids influencing skin status. *Journal of Dermatological Science*, v. 89, n. 2, p. 112–119, fev. 2018.
- KAWAMOTO, A. et al. Oleic acid-induced interleukin-36 γ : A possible link between facial skin redness and sebum. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 22, n. 8, p. 2308–2317, ago. 2023.

- KOH, Y. G. et al. Efficacy and safety of oral palmitoleic acid supplementation for skin barrier improvement: A 12-week, randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *Heliyon*, v. 9, n. 6, p. e16711, jun. 2023.
- KOLOUCHOVÁ, I. et al. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. *Bioresource Technology*, v. 192, p. 726–734, set. 2015.
- LEGENDRE, P.; ANDERSON, M. J. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*, v. 69, n. 1, p. 1–24, fev. 1999.
- LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, v. 129, n. 2, p. 271–280, out. 2001.
- LINEHAN, J. L. et al. Non-classical Immunity Controls Microbiota Impact on Skin Immunity and Tissue Repair. *Cell*, v. 172, n. 4, p. 784- 796.e18, fev. 2018.
- LOVÁSZI, M. et al. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. *The British Journal of Dermatology*, v. 177, n. 6, p. 1671–1682, dez. 2017.
- MALLICK, H. et al. Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *PLOS Computational Biology*, v. 17, n. 11, p. e1009442, 16 nov. 2021.
- MARPLES, R. R.; DOWNING, D. T.; KLIGMAN, A. M. Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes*. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 56, n. 2, p. 127–131, fev. 1971.
- MATHIEU, A. et al. Life on human surfaces: skin metagenomics. *PloS One*, v. 8, n. 6, p. e65288, 2013.
- MCIVER, L. J. et al. bioBakery: a meta’omic analysis environment. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 34, n. 7, p. 1235–1237, 1 abr. 2018.
- MESQUITA, K. Unveiling atopic dermatitis burden in Brazil: a report from clinical assistance perspective. *Jornal Brasileiro de Economia da Saúde*, v. 11, n. 2, p. 153–160, ago. 2019.
- MIN, M. et al. Impact of Pediatric Dermatologic Conditions on Child and Parent Quality of Life. *Cureus*, v. 15, n. 7, p. e42068, jul. 2023.
- MUKHERJEE, S. et al. Stearic acid delivery to corneum from a mild and moisturizing cleanser. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 9, n. 3, p. 202–210, set. 2010.
- MUKHERJEE, S. et al. Sebum and Hydration Levels in Specific Regions of Human Face Significantly Predict the Nature and Diversity of Facial Skin Microbiome. *Scientific Reports*, v. 6, p. 36062, 27 out. 2016.
- NICOLAIDES, N. Skin Lipids: Their Biochemical Uniqueness. *Science*, v. 186, n. 4158, p. 19–26, 4 out. 1974.

- NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*, v. 514, n. 7520, p. 59–64, out. 2014.
- NOOR, N. M. et al. Engineered Dutasteride-Lipid Based Nanoparticle (DST-LNP) System Using Oleic and Stearic Acid for Topical Delivery. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, v. 9, n. 1, p. 11, 1 jan. 2022.
- OH, J. et al. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell*, v. 165, n. 4, p. 854–866, maio 2016.
- OKSANEN, J. et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4. , 2022. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>
- PARK, H. et al. Pilot Study on the Forehead Skin Microbiome and Short Chain Fatty Acids Depending on the SC Functional Index in Korean Cohorts. *Microorganisms*, v. 9, n. 11, p. 2216, 25 out. 2021.
- PAULINO, L. C. New perspectives on dandruff and seborrheic dermatitis: lessons we learned from bacterial and fungal skin microbiota. *European Journal of Dermatology*, v. 27, n. S1, p. 4–7, jun. 2017.
- PROSSER, J. I. et al. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 5, p. 384–392, maio 2007.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2021. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>
- RADNER, F. P. et al. Fat in the skin: Triacylglycerol metabolism in keratinocytes and its role in the development of neutral lipid storage disease. *Dermato-Endocrinology*, v. 3, n. 2, p. 77–83, abr. 2011.
- RAMADAN, M. et al. Skin Microbiome Differences in Atopic Dermatitis and Healthy Controls in Egyptian Children and Adults, and Association with Serum Immunoglobulin E. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, v. 23, n. 5, p. 247–260, maio 2019.
- RAMSEY, M. M. et al. Staphylococcus aureus Shifts toward Commensalism in Response to Corynebacterium Species. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 17 ago. 2016.
- ROSSUM, G. VAN; DRAKE, F. L. The Python language reference. Release 3.0.1 [Repr.] ed. Hampton, NH: Python Software Foundation, 2010.
- ROZAS, M. et al. From Dysbiosis to Healthy Skin: Major Contributions of Cutibacterium acnes to Skin Homeostasis. *Microorganisms*, v. 9, n. 3, p. 628, 18 mar. 2021.
- SANCLEMENTE, G. et al. The impact of skin diseases on quality of life: A multicenter study. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, v. 108, n. 3, p. 244–252, abr. 2017.

- SAYERS, E. W. et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D20–D26, 7 jan. 2022.
- SCHMIDT, T. S. B.; RAES, J.; BORK, P. The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell*, v. 172, n. 6, p. 1198–1215, 8 mar. 2018.
- SCHOLZ, C. F. P.; KILIAN, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 11, p. 4422–4432, nov. 2016.
- SCHOMMER, N. N.; GALLO, R. L. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 12, p. 660–668, dez. 2013.
- SHAPIRO, J. et al. Psoriatic patients have a distinct structural and functional fecal microbiota compared with controls. *The Journal of Dermatology*, v. 46, n. 7, p. 595–603, jul. 2019.
- STAL, S.; SPIRA, M.; HAMILTON, S. Skin morphology and function. *Clinics in Plastic Surgery*, v. 14, n. 2, p. 201–208, abr. 1987.
- SUZEK, B. E. et al. UniRef clusters: a comprehensive and scalable alternative for improving sequence similarity searches. *Bioinformatics*, v. 31, n. 6, p. 926–932, 15 mar. 2015.
- THE SCIKIT-BIO DEVELOPMENT TEAM. *scikit-bio: A Bioinformatics Library for Data Scientists, Students, and Developers*. , 2022. Disponível em: <<http://scikit-bio.org>>
- TRAUPE, H. *The ichthyoses: a guide to clinical diagnosis, genetic counseling, and therapy*. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.
- TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, v. 457, n. 7228, p. 480–484, 22 jan. 2009.
- VAN SMEDEN, J.; BOUWSTRA, J. A. *Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients*. Em: AGNER, T. (Ed.). *Current Problems in Dermatology*. [s.l.] S. Karger AG, 2016. v. 49p. 8–26.
- WANG, X. et al. Comparison of gut microbiota compositions and corresponding genetic and metabolic features between guttate and plaque psoriasis by metagenomic sequencing. *Microbial Pathogenesis*, v. 167, p. 105560, jun. 2022.
- WASKOM, M. *seaborn: statistical data visualization*. *Journal of Open Source Software*, v. 6, n. 60, p. 3021, 6 abr. 2021.
- WEBSTER, G. F.; RUGGIERI, M. R.; MCGINLEY, K. J. Correlation of *Propionibacterium acnes* populations with the presence of triglycerides on nonhuman skin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 5, p. 1269–1270, maio 1981.

- WEIMANN, E. et al. Topical anti-inflammatory activity of palmitoleic acid improves wound healing. *PloS One*, v. 13, n. 10, p. e0205338, 2018.
- WHIPPS, J.; LEWIS, K.; COOKE, R. Mycoparasitism and plant disease control. Em: Fungi in Biological Control Systems. Manchester, UK: Manchester University Press, 1998. p. 161–187.
- WILLE, J. J.; KYDONIEUS, A. Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, v. 16, n. 3, p. 176–187, 2003.
- WILLIAMS, M. R. et al. Staphylococcus aureus Induces Increased Serine Protease Activity in Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 137, n. 2, p. 377–384, fev. 2017.
- WILLIAMS, M. R. et al. Interplay of Staphylococcal and Host Proteases Promotes Skin Barrier Disruption in Netherton Syndrome. *Cell Reports*, v. 30, n. 9, p. 2923- 2933.e7, mar. 2020.
- WINGETT, S. W.; ANDREWS, S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*, v. 7, p. 1338, 2018.
- WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, v. 25, n. 2, p. 92–98, fev. 2016.
- WU, G. et al. Genus-Wide Comparative Genomics of Malassezia Delineates Its Phylogeny, Physiology, and Niche Adaptation on Human Skin. *PLoS genetics*, v. 11, n. 11, p. e1005614, nov. 2015.
- WYSOCKI, A. B. A review of the skin and its appendages. *Advances in Wound Care: The Journal for Prevention and Healing*, v. 8, n. 2 Pt 1, p. 53–54, 56–62, 64 passim, 1995.
- XIAO, S. et al. Deciphering Gut Microbiota Dysbiosis and Corresponding Genetic and Metabolic Dysregulation in Psoriasis Patients Using Metagenomics Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 605825, 2021.
- XIAO, X. et al. The role of short-chain fatty acids in inflammatory skin diseases. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 1083432, 2022.
- XIONG, R.-G. et al. Health Benefits and Side Effects of Short-Chain Fatty Acids. *Foods (Basel, Switzerland)*, v. 11, n. 18, p. 2863, 15 set. 2022.
- XU, J. et al. Dandruff-associated Malassezia genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 47, p. 18730–18735, 20 nov. 2007.

- YAMAMOTO, Y. et al. Lubricant and Bactericidal Properties of Calcium Salts of Fatty Acids: Effect of Degree of Unsaturation. *Journal of Oleo Science*, v. 64, n. 10, p. 1095–1100, 2015.
- YE, Y.; DOAK, T. G. A Parsimony Approach to Biological Pathway Reconstruction/Inference for Genomes and Metagenomes. *PLoS Computational Biology*, v. 5, n. 8, p. e1000465, 14 ago. 2009.
- YUN, J.; LEE, D. G. A novel fungal killing mechanism of propionic acid. *FEMS yeast research*, v. 16, n. 7, p. fow089, nov. 2016.
- ZAMBRUNO, G. Netherton Syndrome. , 2008. Disponível em: <[https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=938&Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=634&Disease\(s\)/group%20of%20diseases=Comel-Netherton-syndrome&title=Comel-Netherton-syndrome&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=938&Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=634&Disease(s)/group%20of%20diseases=Comel-Netherton-syndrome&title=Comel-Netherton-syndrome&search=Disease_Search_Simple)>. Acesso em: 24 ago. 2023
- ZHAO, Q. et al. Intestinal dysbiosis exacerbates the pathogenesis of psoriasis-like phenotype through changes in fatty acid metabolism. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 40, 30 jan. 2023.
- ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, n. 5, p. 723–735, ago. 2008.

ANEXO A - Vias metabólicas diferencialmente abundantes para fenótipos SN e saudável. Foram incluídas descrições resumidas das vias metabólicas.

Via ID	Condição clínica*	Descrição	Superclasse 1	Superclasse 2
PWY-5028	Saudável	Via de degradação da L-histidina II	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Aminoácidos
PWY-6282	Saudável	Via de biossíntese de ácido palmitoleico	Biossíntese	Biossíntese de Lipídios e Ácidos Graxos
SALVADEHYPOX-P WY	Saudável	Via de degradação de nucleotídeos adenosina II	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Nucleotídeos e Nucleosídeos
PWY-7664	Saudável	Via de biossíntese de oleato IV	Biossíntese	Biossíntese de Lipídios e Ácidos Graxos
PWY-6353	Saudável	Via de degradação de nucleotídeos purina II	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Nucleotídeos e Nucleosídeos
PWY-4041	Saudável	Ciclo γ -glutamil	Biossíntese	Outras Biossínteses
PWY0-862	Saudável	Via de biossíntese do 5Z-dodecanoato I	Biossíntese	Biossíntese de Lipídios e Ácidos Graxos

PWY-7761 (1) **	Saudável	Via de recuperação de NAD II	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
PWY-7761 (2)	Saudável	Via de recuperação de NAD II	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
PWY-7761 (3)	Saudável	Via de recuperação de NAD II	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
NAGLIPASYN-PWY (1)	Saudável	Via de biossíntese de lipídio IVa	Biossíntese	Biossíntese de Estruturas Celulares
NAGLIPASYN-PWY (2)	Saudável	Via de biossíntese de lipídio IVa	Biossíntese	Biossíntese de Lipídios e Ácidos Graxos
NAGLIPASYN-PWY (3)	Saudável	Via de biossíntese de lipídio IVa	Vias de Glicanos	Biossíntese de Lipopolissacarídeos
PWY-8073 (1)	Saudável	Via de biossíntese de lipídio IVa	Biossíntese	Biossíntese de Estruturas Celulares
PWY-8073 (2)	Saudável	Via de biossíntese de lipídio IVa	Biossíntese	Biossíntese de Lipídios e Ácidos Graxos
PWY-8073 (3)	Saudável	Via de biossíntese de lipídio IVa	Vias de Glicanos	Biossíntese de Lipopolissacarídeos

PWY-6608	Saudável	Via de degradação de nucleotídeos guanosina III	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Nucleotídeos e Nucleosídeos
P461-PWY (1)	Saudável	Via de fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Álcool
P461-PWY (2)	Saudável	Via de fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Carboidrato
P461-PWY (3)	Saudável	Via de fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
P461-PWY (4)	Saudável	Via de fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
P461-PWY (5)	Saudável	Via de fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação

P461-PWY (6)	Saudável	Via de fermentação de hexitol para lactato, formato, etanol e acetato	Geração de Energia e Metabólitos Precursores	Fermentação
HEME-BIOSYNTHESIS-II-1 (1)	Saudável	Via de biossíntese de heme b V	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
HEME-BIOSYNTHESIS-II-1 (2)	Saudável	Via de biossíntese de heme b V	Biossíntese	Biossíntese de Tetrapirrol
PWY-5675	Saudável	Via de redução de nitrato V	Degradação/Utilização/Assimilação	Metabolismo de Nutrientes Inorgânicos
GLYCOLYSIS-E-D	Saudável	Supervia da glicólise e da via Entner-Doudoroff	Geração de Energia e Metabólitos Precursores	
PYRIDNUCSYN-PWY (1)	Saudável	Via de biossíntese de novo de NAD I	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
PYRIDNUCSYN-PWY (2)	Saudável	Via de biossíntese de novo de NAD I	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
PYRIDNUCSYN-PWY (3)	Saudável	Via de biossíntese de novo de NAD I	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas

GLUTORN-PWY	Saudável	Via de biossíntese da L-ornitina	Biossíntese	Biossíntese de Aminoácidos
GLUCUROCAT-PWY (1)	Saudável	Via de degradação de β -D-glucoronisidas	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Carboidrato
GLUCUROCAT-PWY (2)	Saudável	Via de degradação de β -D-glucoronisidas	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Ácido Carboxílico
PWY-7118 (1)	Saudável	Via de deacetilação de quitina	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Carboidrato
PWY-7118 (2)	Saudável	Via de deacetilação de quitina	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Compostos Poliméricos
PWY-7242 (1)	Saudável	Via de degradação de D-fruturonato	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Carboidrato
PWY-7242 (2)	Saudável	Via de degradação de D-fruturonato	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Ácido Carboxílico
PWY0-1477	Saudável	Via de utilização de etanolamina	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Amida, Amidina, Amina e Poliamina
PWY-6606	Saudável	Via de degradação de nucleotídeos guanosina II	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Nucleotídeos e Nucleosídeos

GLYOXYLATE-BYPA SS	Saudável	Ciclo do Glioxilato	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	
PWY-5989	Saudável	Via de biossíntese de ácido esteárico II	Biossíntese	Biossíntese de Lipídios e Ácidos Graxos
PYRIDOXSYN-PWY	Saudável	Via de biossíntese de piridoxal 5'-fosfato	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
PYRIDOXSYN-PWY	Saudável	Via de biossíntese de piridoxal 5'-fosfato	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
P161-PWY (1)	Saudável	Via de degradação de acetileno	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
P161-PWY (2)	Saudável	Via de degradação de acetileno	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
P161-PWY (3)	Saudável	Via de degradação de acetileno	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
FUCCAT-PWY	Saudável	Via de biossíntese de L-fucose I	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Carboidratos

PWY-1269	Saudável	Via de biossíntese de CMP-3-desoxi-alfa-D-manno- octulosonato	Biossíntese	Biossíntese de Carboidratos
PWY-6507	Saudável	Via de degradação de 4-desoxi-L-treo-hex-4-enopira nuronato	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Carboidratos
PWY-6803	Saudável	Via de edição de acil fosfatidilcolina	Biossíntese	Biossíntese de Lipídios e Ácidos Graxos
PWY-6305	Saudável	Supervia da biossíntese de putrescina	Biossíntese	Biossíntese de Amida, Amidina, Amina e Poliamina
PWY0-845 (1)	Saudável	Via de biossíntese e resgate de piridoxal 5'-fosfato	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
PWY0-845 (2)	Saudável	Via de biossíntese e resgate de piridoxal 5'-fosfato	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
PWY-I9	SN	Via de biossíntese da L-cisteína	Biossíntese	Biossíntese de Aminoácidos

PWY-5345	SN	Supervia da biossíntese de L-metionina	Biossíntese	Biossíntese de Aminoácidos
PWY-6922	SN	Via de biossíntese de L-Nδ-acetilornitina	Biossíntese	Biossíntese de Aminoácidos
PWY-1861	SN	Via de assimilação de formaldeído II	Degradação/Utilização/Assimilação	Utilização e Assimilação de Compostos C1
PWY-6700	SN	Via da biossíntese de queosina I	Modificação de Macromoléculas	Processamento de Ácidos Nucleicos
PWY-6936	SN	Via de biossíntese de seleno-aminoácidos	Biossíntese	Biossíntese de Aminoácidos
ANAEROFrucAT-P WY	SN	Via de fermentação homoláctica	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
HSERMETANA-PWY	SN	Via de biossíntese de L-metionina	Biossíntese	Biossíntese de Aminoácidos
POLYISOPRENSYN-P WY	SN	Via de biossíntese de poliisoprenoide	Biossíntese	Biossíntese de Poliprenil
THISYNARA-PWY (1)	SN	Via de biossíntese de difosfato de tiamina III	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas

THISYNARA-PWY (2)	SN	Via de biossíntese de difosfato de tiamina III	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
PWY-6859	SN	Via de biossíntese de <i>all-trans-farsenol</i>	Biossíntese	Biossíntese de Metabólitos Secundários
PWY-8178	SN	Via da pentose fosfato II	Geração de Energia e Metabólitos Precursores	Vias da Pentose Fosfato
PWY-5981	SN	Via da biossíntese de CDP-diacilglicerol III	Biossíntese	Biossíntese de Lipídios e Ácidos Graxos
PANTO-PWY	SN	Via da biossíntese de fosfopantotenato	Biossíntese	Biossíntese de Cofatores, Carreadores e Vitaminas
P42-PWY	SN	Ciclo do ácido cítrico redutor incompleto	Degradação/Utilização/Assimilação	Utilização e Assimilação de Compostos C1
PWY-5265	SN	Via da biossíntese de peptidoglicano	Biossíntese	Biossíntese de Estruturas Celulares
LACTOSECAT-PWY	SN	Via de degradação da lactose I	Degradação/Utilização/Assimilação	Degradação de Carboidratos

P125-PWY	SN	Via de biossíntese de (R,R)-butanediol	Biossíntese	Outras Biossínteses
PWY-4984	SN	Ciclo da ureia	Degradação/Utilização/Assimilação	Metabolismo de Nutrientes Inorgânicos
P41-PWY (1)	SN	Via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato I	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
P41-PWY (2)	SN	Via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato I	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
P41-PWY (3)	SN	Via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato I	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
P41-PWY (4)	SN	Via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato I	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
PWY-5100 (1)	SN	Via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato II	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação

PWY-5100 (2)	SN	Via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato II	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
PWY-5100 (3)	SN	Via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato II	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
PWY-5100 (4)	SN	Via de fermentação de piruvato para acetato e (S)-lactato II	Geração de Energia e Metabólitos Precusores	Fermentação
PWY-702	SN	Via da biossíntese de L-metionina II	Biossíntese	Biossíntese de Aminoácidos

Fonte: Tabela produzida pelo autor. Tradução livre das superclasses e descrições obtidas no banco *MetaCyc* (CASPI et al., 2020).

* Condição clínica em que a via está mais abundante

** Vias que apresentam mais de uma classificação estão repetidas com o número entre parênteses indicando cada repetição.

ANEXO B - Visão geral das principais funções das vias diferencialmente abundantes, incluindo a quantidade total e por condição clínica.

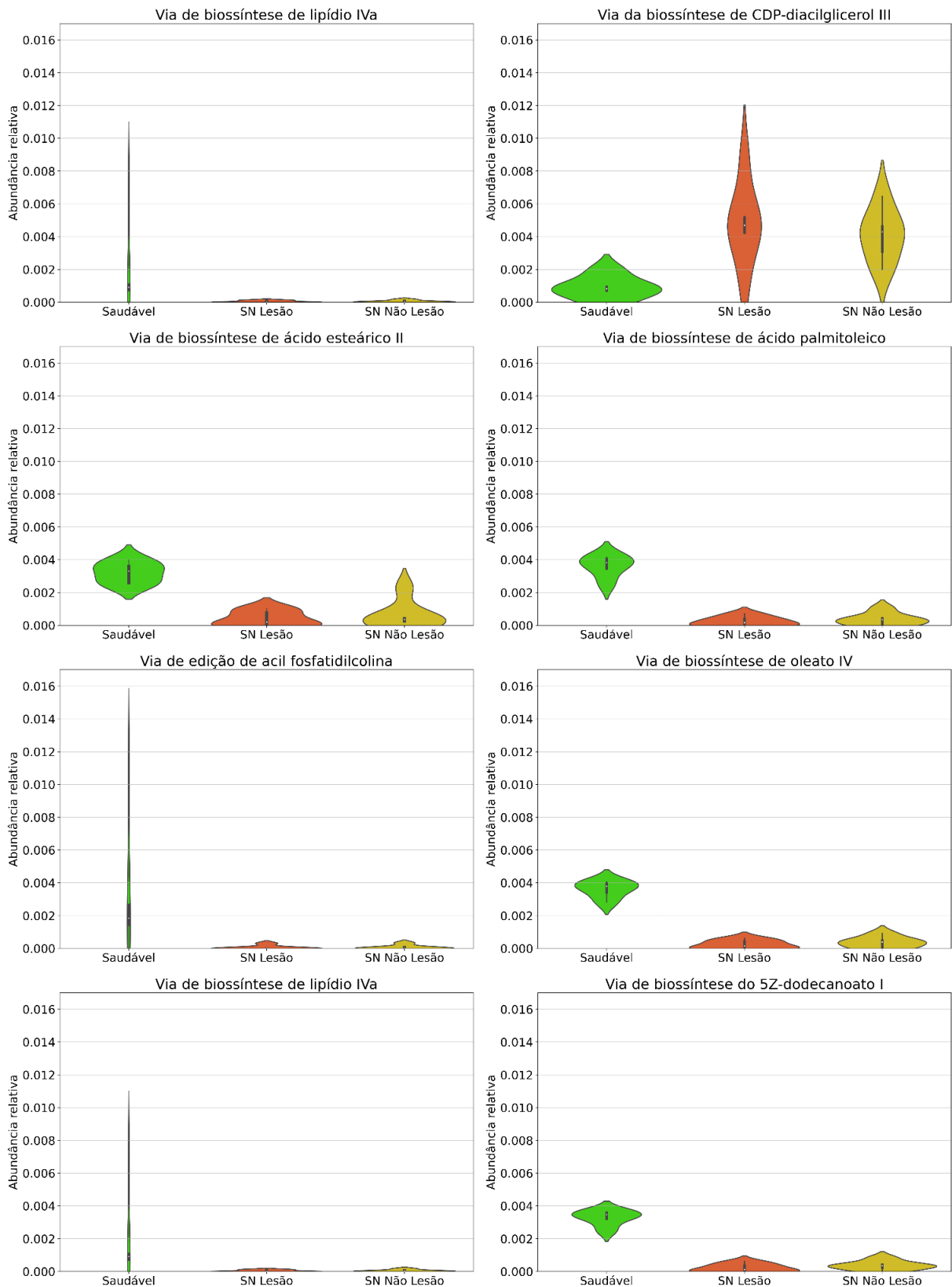
Função	Número total de vias diferencialmente abundantes	Número de vias mais abundantes em saudável	Número de vias mais abundantes em SN
Biossíntese de NAD	2	2	0
Biossíntese de lipídio IVA	2	2	0
Biossíntese de vitamina B6	2	2	0
Degradação de ácido urônico	2	2	0
Degradação de nucleotídeos guanosina	2	2	0
Fermentação para acetato	2	2	0
Fermentação de piruvato para etanol	2	2	0
Biossíntese de L-ornitina	2	1	1
Biossíntese de CMP-3-desoxi- α -D-manno-octulosonato	1	1	0
Biossíntese de 5Z-dodecanoato	1	1	0
Biossíntese de ácido palmitoleico	1	1	0
Biossíntese de heme b	1	1	0
Biossíntese de oleato	1	1	0
Degradação de D-glucoronato	1	1	0
Biossíntese de ácido esteárico	1	1	0

Degradação de 4-desoxi-L-treo-hex-4-enopiranoato	1	1	0
Degradação de L-fucose	1	1	0
Degradação de L-histidina	1	1	0
Degradação de nucleotídeos adenosina	1	1	0
Degradação de quitina	1	1	0
Redução de nitrato	1	1	0
Biossíntese de putrescina	1	1	0
Ciclo γ -glutamil	1	1	0
Degradação de nucleotídeos purina	1	1	0
Edição de acil fosfatidilcolina	1	1	0
Utilização de etanolamina	1	1	0
Ciclo do glioxilato	1	1	0
Supervia da glicólise e da via Entner-Doudoroff	1	1	0
Fermentação para lactato	1	1	0
Degradação de alditol	1	1	0
Biossíntese de novo de L-metionina	3	0	3
Fermentação de piruvato para lactato	2	0	2
Fermentação de piruvato para acetato	2	0	2

Biossíntese de fosfopantotenato	1	0	1
Ciclo do ácido cítrico redutor incompleto	1	0	1
Biossíntese de CDP-diacilglicerol	1	0	1
Biossíntese de L-cisteína	1	0	1
Biossíntese de peptideoglicano	1	0	1
Biossíntese de sesquiterpenoide	1	0	1
Biossíntese de tiamina	1	0	1
Degradação de lactose	1	0	1
Assimilação de formaldeído	1	0	1
Biossíntese de butanediol	1	0	1
Via de biossíntese de seleno-aminoácidos	1	0	1
Via da biossíntese de queuosina I	1	0	1
Ciclo da ureia	1	0	1
Biossíntese de poliprenil	1	0	1
Via da pentose fosfato II	1	0	1

Fonte: Tabela produzida pelo autor. Tradução livre das superclasses e descrições obtidas no banco *MetaCyc* (CASPI et al., 2020).

ANEXO C - Abundância relativa das vias de biossíntese de lipídios diferencialmente abundantes entre as condições “saúdável” e “SN”.



Fonte: Imagem produzida pelo autor.