

João Henrique Rissato

Análise do microbioma intestinal de pacientes com amiloidose transtirretina

São Paulo

2024

João Henrique Rissato

Análise do microbioma intestinal de pacientes com amiloidose transtirretina

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio Fernandes

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rissato, João Henrique

Análise do microbioma intestinal de pacientes com amiloidose transtirretina / João Henrique Rissato; Fábio Fernandes, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1.Amiloidose 2.Microbioma gastrointestinal 3.Insuficiência cardíaca 4.Cardiomiopatias 5.Trato gastrointestinal I.Fernandes, Fábio, orient. II.Título

USP/FM/DBD-384/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

DEDICATÓRIA

A **Jesus Cristo**, fonte de todo Amor sem o qual nada seria possível.

Aos meus pais, **João Rissato** e **Carmen Roman Rissato** (*in memoriam*), pela minha formação fundamental e por cuidarem de mim desde a tenra idade.

A minha esposa **Tatiana**, por todo, apoio, coragem e perseverança. Aos meus filhos **Vitor** e **Ellen**, meus faróis nos momentos de pouca fé.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Fábio Fernandes**, pelos ensinamentos, pela oportunidade e por me mostrar o significado da generosidade através dos gestos.

Ao meu mentor, **Prof. Luciano Nastari**, por toda a diligência ao me conduzir durante os primeiros anos desta jornada.

Aos amigos **Caio Cafezeiro, Bruno Bueno, Aristóteles Neto, Suênia Carvalho** e **Thaís Borges** pelo convívio e estímulo.

Aos meus primeiros mestres na Cardiologia: **Professor Joel Spadaro** (UNESP-Botucatu), **Prof. Roberto Alexandre Franken, Prof. Ronaldo Fernandes Rosa** e **Prof. Luiz Egberto Scavone Ferlante** (Santa Casa de São Paulo) por toda a inspiração.

Aos colegas da Unimed Regional da Baixa Mogiana e Hospital São Francisco de Mogi Guaçu -SP, pelo suporte nos tempos em que tive que me ausentar, em especial ao **Dr. Joaquim Rua**.

A todos os professores da Unidade de Miocardiopatias do Incor: **Dr. Charles Mady, Dr. Félix Ramires, Dr. Edmundo Arteaga, Dr^a. Bárbara Iani, Dr. Juliano Cardoso, Dr. André Dabarian** e a secretária **Roseli Chaves**, por toda a confiança e amparo.

Aos meus irmãos **Américo, Sônia, Rosângela, João Luiz e Sandra** pelos conselhos e incentivo.

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Amiloidose.....	17
1.2 Interface entre coração e intestino.....	18
1.3 Microbioma intestinal humano.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Primário.....	21
2.2 Secundário.....	21
3. JUSTIFICATIVA.....	22
4. HIPÓTESE.....	23
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
5.1 População do estudo.....	24
5.2 Critérios de inclusão.....	24
5.3 Critérios de exclusão.....	25
5.4 Consentimento informado.....	25
5.5 Procedimentos de coleta de fezes para microbioma.....	25
5.6 Questionário.....	26
5.7 Sequenciamento automático e análise de bioinformática.....	28
5.8 Ecocardiograma transtorácico.....	28
5.9 Exames laboratoriais complementares.....	29

5.10	Teste de caminhada de 6 minutos.....	30
5.11	Análise estatística.....	30
6.	RESULTADOS.....	31
6.1	Caracterização dos pacientes.....	31
6.2	Diversidade alfa.....	33
6.3	Diversidade beta.....	34
6.4	Abundância relativa e composição taxonômica.....	35
6.5	Correlação com exames complementares.....	38
6.5.1	Questionário clínico (GSRS).....	38
6.5.2	Marcadores laboratoriais: BNP e troponina.....	40
6.5.3	Parâmetros ecocardiográficos.....	41
6.5.4	Genótipo.....	42
6.5.5	TC6M.....	43
7.	DISCUSSÃO.....	45
8.	CONCLUSÃO.....	49
	ANEXO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL -	Amiloidose derivada de cadeias leves de imunoglobulina
AVDd -	Área do ventrículo direito em diástole
ASV -	<i>Amplicon sequence variant</i>
ATTR -	Amiloidose transtirretina
ATTRh -	Amiloidose transtirretina hereditária
ATTRw -	Amiloidose transtirretina <i>wild type</i>
BNP -	Peptídeo natriurético tipo B
FAC -	<i>Fractional Area Change</i>
FE -	Fração de ejeção
FC -	Frequência cardíaca
GRSR -	<i>Gastrointestinal symptom rating scale</i>
G1 -	Grupo 1
G2 -	Grupo 2
G3 -	Grupo 3
H⁺ -	Íon hidrogênio
IC -	Insuficiência cardíaca

IgA -	Imunoglobulina A
IHQ -	Imunohistoquímica
IMC -	Índice de massa corpórea
IMVE -	Índice de massa do ventrículo esquerdo
LPS -	Lipopolissacarídeo
MGUS -	Gamopatia monoclonal de significado indeterminado
Na -	Íon sódio
NMDS -	Escalonamento multidimensional não métrico
PAD -	Pressão arterial diastólica
PAM -	Pressão arterial média
PAS -	Pressão arterial sistólica
PSAP -	Pressão sistólica de artéria pulmonar
SIVd -	Septo interventricular no final da diástole
SLGVE -	<i>Strain</i> longitudinal global do ventrículo esquerdo
SVD -	Onda S do ventrículo direito
TAPSE -	<i>Tricuspid annular plane systolic excursion</i>

TC6M - Teste de caminhada de seis minutos

TMAO - Trimetilaminaoxidase

TTR - Transtirretina

VAD - Volume do átrio direito

VAE - Volume do átrio esquerdo

VDb - Diâmetro basal do ventrículo direito

VE - Ventrículo esquerdo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características clínicas dos pacientes.....32

Tabela 2- Dados laboratoriais dos pacientes.....32

Tabela 3- Características ecocardiográficas dos pacientes.....33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Interface entre insuficiência cardíaca e microbioma intestinal.....	19
Figura 2- Dispositivo utilizado para a coleta das amostras fecais.....	26
Figura 3- Versão validada em língua portuguesa do <i>gastronintestinal symptom rating scale</i> - GSRS.....	27
Figura 4- Distribuição dos pacientes segundo genótipo.....	31
Figura 5- Comparação dos grupos segundo diversidade alfa.....	34
Figura 6- Comparação dos grupos segundo diversidade beta, utilizando o índice de Bray-Curtis.....	35
Figura 7- Abundância relativa dos filos bacterianos nos três grupos de participantes....	36
Figura 8- Abundância relativa das classes bacterianas nos três grupos de participantes.....	36
Figura 9- Abundância relativa das ordens bacterianas nos três grupos de participantes.....	37
Figura 10- Abundância relativa das famílias bacterianas nos três grupos de participantes.....	37
Figura 11- Abundância relativa em nível de gênero bacteriano nos três grupos de pacientes estudados (<i>heat map</i>).....	38
Figura 12- Correlação entre sintomas gastrointestinais gerais e abundância relativa dos táxons bacterianos.....	39

Figura 13- Correlação entre sintomas intestinais baixos e abundância relativa dos táxons bacterianos.....	40
Figura 14- Correlação entre níveis de troponina I e abundância relativa dos táxons bacterianos.....	41
Figura 15- Correlação entre níveis de BNP e abundância relativa dos táxons bacterianos.....	41
Figura 16- Correlação entre VAE e abundância relativa dos táxons bacterianos.....	42
Figura 17- Correlação entre índice de massa cardíaca e abundância relativa dos táxons bacterianos.....	42
Figura 18- Correlação entre genótipo dos pacientes e abundância relativa dos gêneros bacterianos.....	43
Figura 19- Correlação entre TC6M e abundância relativa dos gêneros bacterianos.....	43
Figura 20- Sumário das associações entre as variáveis analisadas.....	44

RESUMO

Rissato JH. *Análise do microbioma intestinal de pacientes com amiloidose transtirretina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

INTRODUÇÃO: A amiloidose transtirretina é uma doença sistêmica caracterizada pelo acúmulo da proteína amiloide em diversos órgãos e tecidos, incluindo o trato digestivo e o coração. Disautonomia e depósitos amiloides no parênquima digestivo podem provocar disbiose. De outro modo, hipoperfusão e edema determinados pela insuficiência cardíaca também podem contribuir para alterações do microbioma intestinal. **OBJETIVO:** Identificar a composição do microbioma intestinal em pacientes com amiloidose transtirretina com e sem acometimento cardíaco e em voluntários sem amiloidose. Correlacionar os grupos taxonômicos encontrados com escore de sintomas gastrointestinais, genótipo, ecocardiograma e marcadores laboratoriais. **MÉTODOS:** Foram incluídos 60 participantes, 20 com amiloidose transtirretina com acometimento cardíaco (G1) e outros 19 sem cardiopatia (G2), e 21 controles que coabitam com os doentes (G3). Todos os 60 participantes tiveram o perfil do microbioma obtido por sequenciamento do gene 16S rRNA (Illumina® Miseq) e responderam ao questionário clínico de sintomas gastrintestinais. Para os 39 doentes também foram avaliados dados de ecocardiograma, teste de caminhada de seis minutos, dosagens de troponina e BNP, e genótipo. **RESULTADOS:** G1 e G2 apresentaram os grupos *Streptococcus*, *Lachnospiraceae* UCG-003 e *Sellimonas* diferencialmente abundantes quando comparados ao G3, enquanto nos controles destacou-se a maior abundância relativa de *Methanosphaera*. *Streptococcus* esteve associado a maiores níveis de troponina. *Lachnospiraceae* UCG-003 associou-se a menores níveis de BNP e menores volumes do átrio esquerdo. Já *Sellimonas* esteve associada a maior escore de sintomas intestinais, enquanto *Methanosphaera* a sintomas intestinais menos intensos. Maiores níveis de troponina, genótipo alterado e pior desempenho no teste de caminhada estiveram associados a *Intestinimonas*. **CONCLUSÃO:** Pacientes com amiloidose transtirretina apresentaram perfil do microbioma intestinal distinto dos controles e houve correlação com parâmetros ecocardiográficos, biomarcadores de necrose e IC, genótipo sintomas gastrintestinais e teste de caminhada de 6 minutos.

Palavras-chave: Amiloidose, Microbioma gastrointestinal, Insuficiência cardíaca, Cardiomiopatias, Trato gastrointestinal.

ABSTRACT

Rissato JH. *Analysis of the intestinal microbiome of patients with transthyretin amyloidosis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

INTRODUCTION: Transthyretin amyloidosis is a systemic disease characterized by the accumulation of amyloid protein in various organs and tissues, including the digestive tract and the heart. Dysautonomia and amyloid deposits in the digestive parenchyma can cause dysbiosis. Otherwise, hypoperfusion and edema caused by heart failure can also contribute to changes in the intestinal microbiome. **OBJECTIVE:** To identify the intestinal microbiome composition in patients with transthyretin amyloidosis with and without cardiac involvement and in volunteers without amyloidosis. Correlate the taxonomic groups found with gastrointestinal symptom scores, genotype, echocardiogram, and laboratory markers. **METHODS:** Sixty participants were included, 20 with transthyretin amyloidosis with cardiac involvement (G1) and another 19 without heart disease (G2), in addition to 21 controls who cohabit with the patients (G3). All 60 participants had their microbiome profile obtained by sequencing the 16S rRNA gene (Illumina® Miseq) and completed a clinical questionnaire on gastrointestinal symptoms. For the 39 patients, echocardiogram data, six-minute walk test, troponin, BNP measurements, and genotype were also evaluated. **RESULTS:** G1 and G2 presented the *Streptococcus*, *Lachnospiraceae* UCG-003, and *Sellimonas* groups as differentially abundant compared to G3, while the controls showed a greater relative abundance of *Methanosphaera*. *Streptococcus* was associated with higher troponin levels. *Lachnospiraceae* UCG-003 was associated with lower BNP levels and smaller left atrium volumes. *Sellimonas* was associated with a higher score of intestinal symptoms, while *Methanosphaera* had less intense intestinal symptoms. Higher troponin levels, altered genotype, and worse performance on the walking test were associated with *Intestinimonas*. **CONCLUSION:** Patients with transthyretin amyloidosis presented an intestinal microbiome profile distinct from controls, and there was a correlation with echocardiographic parameters, biomarkers of necrosis and heart failure, genotype, gastrointestinal symptoms, and a 6-minute walk test.

Keywords: Amyloidosis, Gastrointestinal Microbiome, Heart Failure,
Cardiomyopathies, Gastrointestinal Tract.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Amiloidose

A amiloidose é uma doença sistêmica caracterizada pelo acúmulo da proteína amiloide em diversos órgãos e tecidos, incluindo o coração, nervos periféricos e intestinos. O acometimento cardíaco tem grande impacto no prognóstico e pode ocorrer nas suas duas principais formas: 1 - adquirida de cadeia leve monoclonal (AL) e 2 - transtirretina (ATTR), nas formas hereditária (ATTRh) ou selvagem (ATTRw) (1). A fisiopatogenia decorre basicamente da deposição de uma proteína anormal (amilóide) com propriedades tóxicas ao miócito. Mesmo com os avanços das técnicas diagnósticas e terapêuticas, o prognóstico permanece reservado (2). Frequentemente o diagnóstico pode ser ignorado ou realizado tardiamente, de maneira que as opções de tratamento se tornam mais limitadas e a sobrevida reduzida. Deste modo, o reconhecimento precoce desta patologia se torna indispensável para cessar o mecanismo da doença antes que as alterações irreversíveis ocorram. O escopo deste estudo foi a amiloidose do tipo transtirretina (ATTR).

A proteína transtirretina (TTR) é sintetizada e secretada na circulação sanguínea principalmente pelo fígado. O plexo coróide produz e libera a TTR no líquido enquanto as células do epitélio retiniano pigmentado também são capazes de produzi-la e liberá-la no corpo vítreo. Antigamente chamada de pré-albumina, a TTR é composta por quatro monômeros que circulam na forma tetramérica. Esta proteína apresenta a função de carrear retinol e tiroxina (3).

O evento preponderante da fisiopatologia é a degeneração do tetrâmero proteico e sua deposição nos diferentes fluidos em que está presente (4,5). Dada a natureza sistêmica da fisiopatogenia, clinicamente a ATTR pode determinar sinais e sintomas oftalmológicos, como opacidade vítrea e glaucoma, insuficiência renal e proteinúria, disfunção erétil e síndrome do túnel do carpo. Também pode se manifestar isoladamente como uma polineuropatia ou como cardiomiopatia. Eventualmente, o fenótipo pode envolver ambas as manifestações (6). No coração, este processo causa espessamento, rigidez e variados graus de disfunção diastólica e sistólica secundários à toxicidade intrínseca dessas fibrilas e à própria infiltração tecidual. Alterações do sistema de

condução cardíaca e arritmias podem preceder a insuficiência cardíaca em alguns anos (7).

Do mesmo modo, os sintomas digestivos decorrentes da ATTR constituem um dos aspectos mais relevantes e precoces da clínica da polineuropatia amiloidótica, sendo resultado tanto da disautonomia neurovegetativa quanto da infiltração do parênquima intestinal. Dentro do espectro de alterações, podem advir diferentes graus de distúrbios do trânsito intestinal, manifestos como diarreia, constipação e náuseas (8–10).

O emagrecimento é consequência característica progressiva e importante, habitualmente precoce e constante. Pode estar ligado às manifestações gastrointestinais, má-absorção ou perdas proteicas renais e digestivas. Constitui uma das manifestações de pior prognóstico da doença (11).

1.2 Interface entre coração e intestino

Tal qual o eixo cérebro-intestino, atualmente já está bem estabelecida a relação entre o coração e o intestino (12). Em cenário clínico de insuficiência cardíaca (IC) de qualquer etiologia, inclusive por ATTR, observa-se hipoperfusão tecidual sistêmica devido ao baixo débito cardíaco e à vasoconstrição decorrente da ativação neuroendócrina. A hipóxia resultante da hipoperfusão das vilosidades intestinais desencadeia acidose intracelular. Em condições normais, a absorção de sódio ingerido com os alimentos ocorre através de uma bomba trocadora de íons sódio (Na) e hidrogênio (H^+). Para correção da acidose intracelular essa bomba é hiper ativada, provocando exteriorização para o lúmen intestinal de íons H^+ , enquanto mais íons Na são absorvidos. Assim, fecha-se uma alça de um círculo vicioso de piora da IC com maior retenção de líquidos, acompanhando a internalização de Na. De outra maneira, a mudança do pH intestinal, agora tendendo à acidificação, privilegia o desenvolvimento de certos grupos de microrganismos em detrimento de outras populações bacterianas outrora predominantes. Ominosamente, enquanto há crescimento do número de microrganismos intestinais produtores de metabólitos prejudiciais ao sistema circulatório como a trimetilaminaoxidase (TMAO), ocorre decréscimo de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta como o butirato, um substrato trófico para o enterócito.

Na outra frente deste círculo vicioso, face ao aumento da pré-carga também secundária à IC, a vilosidade intestinal tende a edema e os enterócitos estão sujeitos a menor oferta de fatores tróficos, de modo a fragilizar barreira intestinal e facilitar a translocação bacteriana. Pacientes com IC avançada apresentam maiores níveis circulantes de imunoglobulina A (IgA) anti-lipopolissacarídeo (LPS), um constituinte das paredes de bactérias gram negativas.

Deste modo, infere-se que as alterações do microbioma intestinal possivelmente presentes em pacientes com ATTR resultem não apenas de desordens relacionadas trato digestivo (disautonomia e depósito no próprio parênquima intestinal), mas também da hipoperfusão e edema intestinal secundária à IC conforme a evolução da doença (Figura 1).

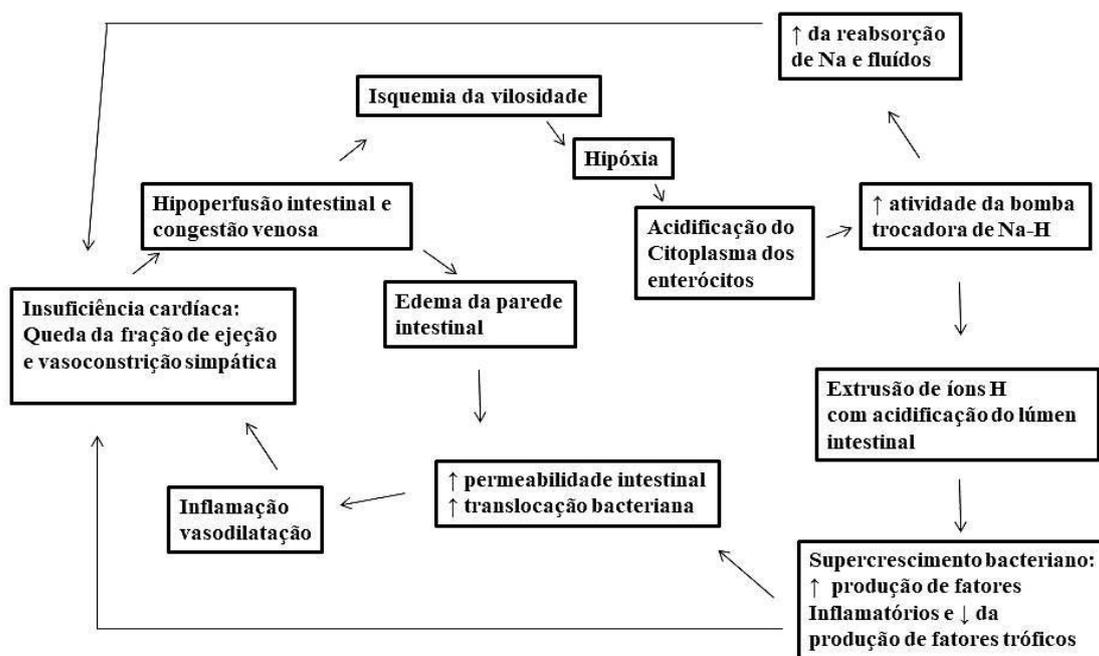


Figura 1 – Interface entre insuficiência cardíaca e microbioma intestinal

1.3 Microbioma intestinal humano

O microbioma intestinal humano é muito variado, sendo estimado em cerca de cem trilhões de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus (13). É único em cada indivíduo e determinado tanto por fatores genéticos quanto pela idade, tipo de

parto, uso de antibióticos e dieta (14–16). Há evidências que tais microrganismos assumem papel fundamental na digestão de alimentos, síntese de vitaminas, produção de ácidos graxos de cadeia curta, modulação do sistema imune e proteção contra infecções. Em indivíduos saudáveis, costumam predominar bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, seguidos por Verrucomicrobia e Actinobacteria (17). No entanto, as proporções relativas e as espécies presentes podem variar bastante entre indivíduos e oscilar ao longo do tempo, particularmente durante as fases iniciais da vida e durante a evolução de certas doenças. Destaca-se que, ao se referir o termo microbiota, abrange-se o grupo de microrganismos que vivem em um bioma ou habitat em particular. Esse habitat pode ser um nicho anatômico, como o intestino, ou ambiental, como o solo. Ao se abordar o microbioma, trata-se o conjunto do material genético desses mesmos microrganismos.

O microbioma intestinal desempenha papel crucial na saúde e no bem-estar do organismo, influenciando desde a digestão até a regulação do sistema imunológico. Diversas pesquisas indicam que a resiliência do microbioma intestinal tem papel no processo de desenvolvimento de doenças como obesidade, infarto do miocárdio e hipertensão arterial sistêmica (18,19).

Um dos aspectos fundamentais para compreender plenamente a complexidade desse ecossistema, é o estudo da diversidade microbiana. Neste trabalho analisamos a diversidade alfa e beta do microbioma intestinal. A diversidade alfa refere-se à riqueza e à uniformidade das espécies presentes em uma única amostra de microbioma intestinal, descrevendo então a variedade de microrganismos dentro de um único indivíduo. Medir a diversidade alfa envolve a contagem de diferentes espécies bacterianas e a avaliação de sua distribuição relativa. Uma maior diversidade alfa indica um microbioma mais saudável e resiliente, associado a uma série de benefícios para a saúde, como a resistência a infecções, a regulação do metabolismo e a redução do risco de doenças crônicas. Por outro lado, a diversidade beta analisa a variabilidade entre diferentes amostras de microbioma. Essa medida avalia a similaridade ou dissimilaridade das composições microbianas entre as amostras. Mudanças significativas na diversidade beta podem estar associadas a condições patológicas, como doenças inflamatórias intestinais, obesidade e distúrbios metabólicos (20).

2. OBJETIVOS

2.1 Primário

- Identificar a composição do microbioma intestinal em três grupos de pacientes: grupo 1 (G1) - ATTR com acometimento cardíaco; grupo 2 (G2) - ATTR sem acometimento cardíaco; grupo 3 (G3) - grupo controle sadio que convive e compartilha hábitos alimentares semelhantes aos dos doentes.

2.2 Secundário

- Correlacionar os grupos taxonômicos identificados com escore de sintomas clínicos gastrintestinais, genótipo, dados de ecocardiograma, marcadores laboratoriais: peptídeo natriurético tipo B (BNP) e troponina I, e teste de caminhada de seis minutos (TC6M).

3. JUSTIFICATIVA

A interação entre os sistemas cardiovascular e intestinal se dá por diferentes vias. Uma dessas vias envolve alterações do microbioma intestinal. Até o momento não se tem notícia de estudos relacionando o microbioma intestinal a ATTR cardíaca especificamente.

4. HIPÓTESE

Devem existir padrões taxonômicos no microbioma intestinal que diferenciam os doentes do grupo controle.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 População do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo transversal. Foram selecionados 61 pacientes de ambos os sexos, com idades entre 18 e 90 anos, em seguimento no ambulatório da Unidade Clínica de Miocardiopatias do Instituto do Coração-HC-FMUSP. Do total de participantes, foram recrutados 20 pacientes com amiloidose ATTR com acometimento cardíaco (G1), 19 pacientes com amiloidose ATTR sem acometimento cardíaco (G2) e 21 pacientes (grupo controle) que coabitam e compartilham hábitos alimentares semelhantes aos dos doentes (G3). No grupo 2 houve uma exclusão de recrutamento por perda do dispositivo coletor de fezes pelo paciente.

A inclusão dos pacientes se deu ao longo de 12 meses (de janeiro de 2022 a janeiro de 2023).

5.2 Critérios de inclusão

- **Idade e Sexo**

- a) Idade acima de 18 até 90 anos; ambos os sexos.

- **Características do paciente e da doença**

- a) Diagnóstico de amiloidose transtirretina forma *wild type* (ATTRw) e pacientes com a forma hereditária (ATTRh) documentada por mutação patogênica da transtirretina;

- b) Para a definição de acometimento cardíaco por ATTR devem-se apresentar todos os critérios abaixo:

- Evidência de envolvimento cardíaco pela ecocardiografia ou ressonância nuclear magnética com a medida do septo interventricular no final da diástole (SIVd) > 12mm;
- Cintilografia miocárdica com tecnécio pirofosfato com graus 2 ou 3 de captação, na ausência de imunoglobulinas circulantes;

- Na presença de hipergamaglobulinemia de significado incerto (MGUS), foi necessária a confirmação da proteína TTR no tecido através da imuno-histoquímica (IHQ) ou espectrometria de massa.

5.3 Critérios de exclusão

- História de doença intestinal inflamatória;
- Diarreia persistente por mais de duas semanas nos dois meses que antecederam a coleta de fezes;
- Uso de antibióticos e/ou suplementos prebióticos e probióticos nos dois meses que antecederam a coleta.

5.4 Consentimento informado

Após terem sido orientados de forma completa sobre o protocolo da pesquisa, todos os pacientes incluídos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo).

Este projeto foi submetido à análise da comissão de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) inserido no âmbito do estudo ELAST2D, tendo sido aprovado conforme parecer número 5712868. O estudo AMIAT foi apoiado financeiramente por patrocínio concedido pela empresa Pfizer (*application* – ID 55925015).

5.5 Procedimentos de coleta de fezes para microbioma

Os participantes foram orientados a lavar as mãos e, em seguida, a defecarem em um coletor apropriado, evitando eventual contaminação com elementos do vaso sanitário. Na figura 2 foi ilustrado o método utilizado para a coleta das amostras de fezes.



Figura 2 - Dispositivo utilizado para a coleta das amostras fecais

As amostras foram colhidas na casa dos participantes. Dentro de um recipiente apropriado, as fezes ficavam conservadas em solução com guanidina em geladeira (6 a 7°C), até serem entregues em no máximo três dias à unidade de pesquisa clínica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP), onde foram armazenadas em -20°C até a análise.

5.6 Questionário

A gravidade dos sintomas gastrointestinais foi avaliada através de questionário clínico específico (*gastrointestinal symptom rating scale – GSRS*) validado em língua portuguesa (21) (Figura 3). O escore de cada paciente se constitui através de 15 perguntas às quais são atribuídos valores de acordo com a intensidade e frequência de sintomas como diarreia, constipação intestinal, incontinência fecal, náuseas, vômitos e plenitude gástrica.

Questionário GSRS

Nome: _____ Data: _____

Por favor, para cada questão **dê uma nota de 1 a 7**, conforme a escala abaixo:

Escala de resposta (em intensidade ou frequência):

1. Nenhum desconforto / nenhuma vez
2. Desconforto mínimo / raras vezes
3. Desconforto leve / pouquíssimas vezes
4. Desconforto moderado / poucas vezes
5. Desconforto moderadamente severo / algumas vezes
6. Desconforto forte / muitas vezes
7. Desconforto muito forte / muitíssimas vezes

1. Você teve dores abdominais durante a semana passada? (Dor se refere a todos os tipos de dores no estômago ou de intestino/barriga).

Resposta: _____ Observação: _____

2. Você sentiu azia durante a semana passada? (Por azia queremos dizer uma dor em queimação ou desconforto em seu peito).

Resposta: _____ Observação: _____

3. Você sentiu refluxo ácido durante a semana passada? (Por refluxo ácido queremos dizer: regurgitação ou fluxo de fluido azedo ou amargo na boca).

Resposta: _____ Observação: _____

4. Você sentiu dor de fome no estômago durante a semana passada? (Esta sensação de estômago vazio está associada com a necessidade de comer entre as refeições).

Resposta: _____ Observação: _____

5. Você sentiu náuseas durante a semana passada? (Por náuseas queremos dizer uma sensação de mal estar iminente – parece que vai vomitar).

Resposta: _____ Observação: _____

6. Seu estômago ou barriga roncou durante a semana passada? (Ronco refere-se a barulhos ou ruídos no estômago).

Resposta: _____ Observação: _____

7. Você sentiu o seu estômago cheio de ar durante a semana passada? (Sentir o estômago cheio de ar se refere ao inchaço no estômago ou barriga).

Resposta: _____ Observação: _____

8. Você arrotou durante a semana passada? (Arrotar refere-se a trazer ar ou gás através da boca).

Resposta: _____ Observação: _____

9. Você eliminou gases ou teve flatulência durante a semana passada? (Eliminar gases ou flatulência refere-se à liberação de ar ou gás a partir do intestino).

Resposta: _____ Observação: _____

10. Você teve constipação/prisão de ventre durante a semana passada? (Constipação refere-se a uma capacidade reduzida de defecar).

Resposta: _____ Observação: _____

11. Você teve diarreia durante a semana passada? (Diarreia refere-se a fezes moles ou líquidas frequentes).

Resposta: _____ Observação: _____

12. Você teve/apresentou fezes moles durante a semana passada? (Se as fezes foram alternadamente duras e moles, essa questão refere-se apenas ao quanto você se sentiu incomodado pelas fezes moles).

Resposta: _____ Observação: _____

13. Você teve/apresentou fezes duras durante a semana passada? (Se as fezes foram alternadamente duras e moles, essa questão refere-se apenas ao quanto você se sentiu incomodado pelas fezes duras).

Resposta: _____ Observação: _____

14. Você sentiu uma necessidade urgente de evacuar durante a semana passada? (Por necessidade urgente entenda-se necessidade de correr ao banheiro para defecar).

Resposta: _____ Observação: _____

15. Ao ir ao banheiro durante a semana passada, você teve a sensação de não esvaziar completamente o intestino? (A sensação de que depois de terminar uma defecação, ainda há mais fezes que precisam ser eliminadas).

Resposta: _____ Observação: _____

Figura 3 – Versão validada em língua portuguesa do *gastronintestinal symptom rating scale* - GSRS

5.7 Sequenciamento automático e análise de bioinformática

O sequenciamento automático das amostras e análise de bioinformática foram realizados pelo laboratório Varsomics, unidade do Hospital Israelita Albert Einstein. A caracterização do microbioma foi realizada pela amplificação dos domínios V3 e V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano. O preparo de bibliotecas foi seguido pelo sequenciamento de alto desempenho através da plataforma MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). As análises de beta e alfa diversidade para os índices de Chao e Shannon foram realizadas utilizando o plugin *q2-diversity*. A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelo software FastQC (22) e posteriormente analisadas no software Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 (QIIME2 v.2022.2) (23). A ferramenta Dada 2 (24) foi utilizada através do *q2-dada2* para obter as variantes de sequências observadas (ASVs). A classificação taxonômica foi realizada utilizando o *q2-feature-classifier* com banco de dados Silva v138 (25). As figuras de composição taxonômica e diversidade foram geradas através do software R v4.1.0 utilizando o RStudio e os pacotes *vegan* v2.5, *phyloseq* v1.36.0 e *ggplo2* v3.3.5.

5.8 Ecocardiograma transtorácico

O ecocardiograma de repouso foi realizado em equipamento Vivid E9 (GE Healthcare) com imagem em segunda harmônica, equipado de transdutores multifrequenciais. Todas as medidas foram obtidas conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (ASE), por mais de um examinador, admitindo-se variabilidade de até 10%. Todas as imagens foram armazenadas em formato digital (DICOM) para posterior análise. Os pacientes foram posicionados em

decúbito dorsal semi-lateral esquerdo. Em seguida foram adquiridas imagens dos planos paraesternal eixo curto e longo, apical quatro e duas câmaras, além do subcostal. Foram feitas as seguintes medidas: diâmetro da aorta e do átrio esquerdo, diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), espessura diastólica do septo interventricular e da parede posterior do VE para cálculo da massa e índice de massa do VE. Através dos planos apicais quatro e duas câmaras foram obtidos os volumes sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo para cálculo da fração de ejeção (FE), além das medidas do volume máximo do átrio esquerdo (VAE) (no final da diástole ventricular, imediatamente antes da abertura da valva mitral), ambas pelo método de *Simpson*.

À janela apical a interrogação *Doppler* foi posicionada na borda do folheto mitral para avaliar as ondas E e A, o tempo de desaceleração e a variação da onda E. Já com o *Doppler* tecidual se avaliou a excursão do anel mitral e as velocidades de relaxamento diastólico (e') medial e lateral. Outro dado obtido pela utilização dessas medidas foi a relação E/e' . A partir desses dados, a função diastólica foi classificada como normal, disfunção diastólica tipo I (padrão de alteração do relaxamento), tipo II (padrão pseudonormal) e tipo III (padrão restritivo).

5.9 Exames laboratoriais complementares

As concentrações plasmáticas do BNP e da troponina I foram dosadas por imunoensaio tipo sanduíche com quimioluminescência direta. Para a obtenção do BNP foi utilizado o kit comercial ADVIA Centaur® (Siemens Medical Solutions Diagnostic, Los Angeles, CA, USA) e para troponina I o kit comercial ADVIA Centaur® TnI- Ultra (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). As amostras foram avaliadas em equipamento automatizado de mesma marca. Os resultados foram expressos em pg/mL para o BNP (valor de referência inferior a 100 pg/mL) e em ng/dL para a Troponina I (valor de referência de 0,04 ng/dL, percentil 99%).

5.10 Teste de caminhada de 6 minutos

O teste foi realizado em um corredor com distância demarcada de 30 metros. Foi avaliada a distância percorrida e o grau de dispneia inicial do paciente e ao final do exame.

5.11 Análise estatística

As análises estatísticas para comparação de alfa diversidade foram realizadas utilizando o teste Kruskal-Wallis e para beta diversidade foi utilizado o teste de Permanova. O método de análise de abundância diferencial escolhido foi o DESeq2, originalmente desenvolvido para análises de expressão diferencial em RNA-Seq e que foi validado para análises de metagenômica. Para identificação de táxons diferencialmente abundantes, utilizou-se o critério de P-valor ajustado < 0.05 , com a correção de testes múltiplos padrão do DESeq2 (FDR). Para aumentar a robustez dos resultados, foram incluídos na análise apenas táxons detectados em pelo menos cinco amostras.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização dos pacientes

A média de idade dos pacientes incluídos no estudo foi de 58,01 anos. Pouco mais da metade (51,66%) eram de indivíduos do sexo masculino. Dentre os 39 pacientes dos grupos G1 e G2, 15% eram portadores da forma selvagem da ATTR, enquanto a maioria (85%) apresentava a forma hereditária da doença. Entre os portadores da ATTRh, a mutação mais frequentemente encontrada foi a Val142Ile (52,9%) seguida pela Val50Met (17,6%). O conjunto dos demais genótipos alterados representou 26,4% dos pacientes (Figura 4).

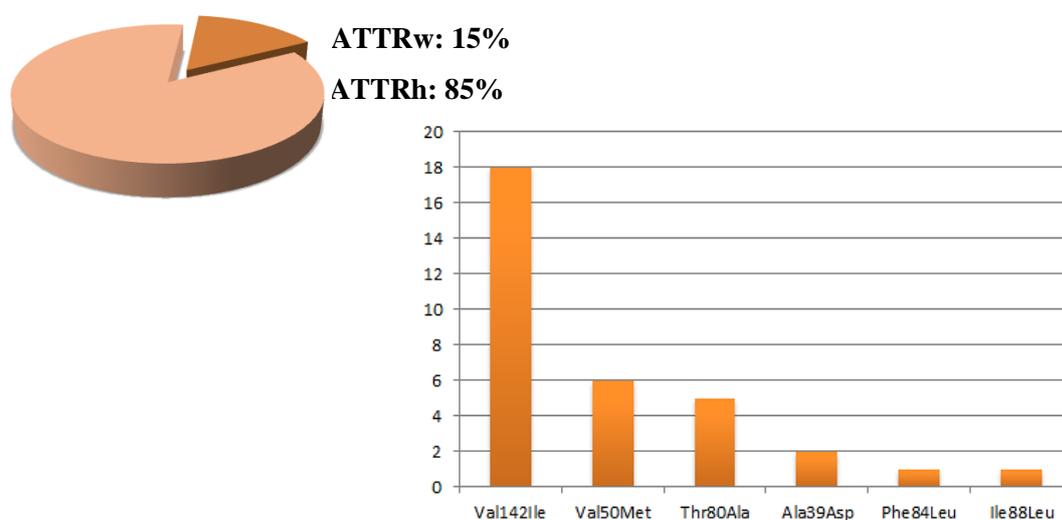


Figura 4 - Distribuição dos pacientes segundo genótipo

As características clínicas, dados laboratoriais e características ecocardiográficas dos pacientes podem ser observadas nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes

	Grupo 1 (n=20)	Grupo 2 (n=19)	Grupo 3 (n=21)	Valor p
Idade (anos)	73.8±9.1	42.58±10.87	55.26±20.68	<0.05
Sexo (M/F)	17/3	12/7	3/18	<0.05
Pressão arterial sistólica (mmHg)	119.33±18.14	128.26±17.95	124.71±10.62	0,210
Pressão arterial diastólica (mmHg)	74.52±12.67	84.32±11.23	77.19±6.8	0,010
Pressão arterial média (mmHg)	89.14±13.63	98.58±12.14	92.71±6.81	0,030
Frequência cardíaca (bpm)	72.67±11.93	70.42±9.86	74.05±10.46	0,570
Oximetria (%)	96.19±1.99	97.47±1.07	97.38±0.92	0,008
PESO (kg)	67.14±10.18	73.84±15.38	70.33±10.05	0,220
Altura (cm)	165.76±5.44	168.42±7.77	163.29±6.73	0,060
Índice de massa corpórea (kg/m²)	24.4±3.1	25.67±4.91	26.37±3.14	0,240
Escore questionário clínico	26.48±8.66	24.74±9.60	25.62±7.3	0,810
Distância teste caminhada 6 min (M)	355.52±77.28	422.23±115.65		0,589
HAS	8 (40%)	2 (10.53%)	3 (14.89%)	0,097
DM	8 (40%)	0	4 (19.05%)	0,008
DLP	7 (35%)	1 (5.26%)	4 (19.05%)	0,067

NOTA: Os valores estão expressos como valor absoluto (porcentagem), média +/- desvio padrão

Tabela 2 - Dados laboratoriais dos pacientes

	Grupo 1 (n=20)	Grupo 2 (n=19)	Valor p
BNP (pg/mL)	484.26±309.42	21.37±20.76	0,033
Troponina (ng/L)	46.93±45.39	7.42±10.95	0,228

NOTA: Os valores foram expressos como média.

Tabela 3 – Características ecocardiográficas dos pacientes

	Grupo 1 (n=20)	Grupo 2 (n=19)	Valor p
FEVE (%)¹	45.05±12.26	59.16±3.06	0,166
Índice de massa do VE (g/m²)	172.16±40.06	73.84±15.85	0,002
SLGVE (%)²	8.97±2.94	17.71±1.90	0,002
Volume do AE³ (mL/m²)	58.15±13.34	28.63±3.92	0,003
Volume do AD⁴ (mL/m²)	41.7±17.55	19.74±4.95	0,077
Diâmetro basal do VD⁵ (mm)	37.4±6.13	34.37±5.25	0,405
PSAP (mmHg)⁶	44.88±11.94	24.40±2.53	0,017
Área do VD em diástole	17.98±9.48	19.20±5.83	0,913
FAC (%)⁷	34.7±9.46	46.56±10.85	0,184
Velocidade onda S do VD (m/s)	6.69±2.87	11.17±2.23	0,056
TAPSE⁸	12.88±4.97	20.89±3.36	0,067

NOTA: Os valores estão expressos como média +/- desvio padrão.

¹ FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

² LGVE, *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo.

³ AE, átrio esquerdo.

⁴ AD, átrio direito.

⁵ VD, ventrículo direito.

⁶ PSAP, pressão sistólica de artéria pulmonar.

⁷ FAC, *fraccional area change*.

⁸ TAPSE, *tricuspid anular plane systolic excursion*.

6.2 Diversidade alfa

Os índices de Chao e Shannon foram superiores no grupo controle, entretanto, não foi demonstrada diferença significativa entre os três grupos quando aplicado o teste de Kruskal-Wallis (Figura 5).

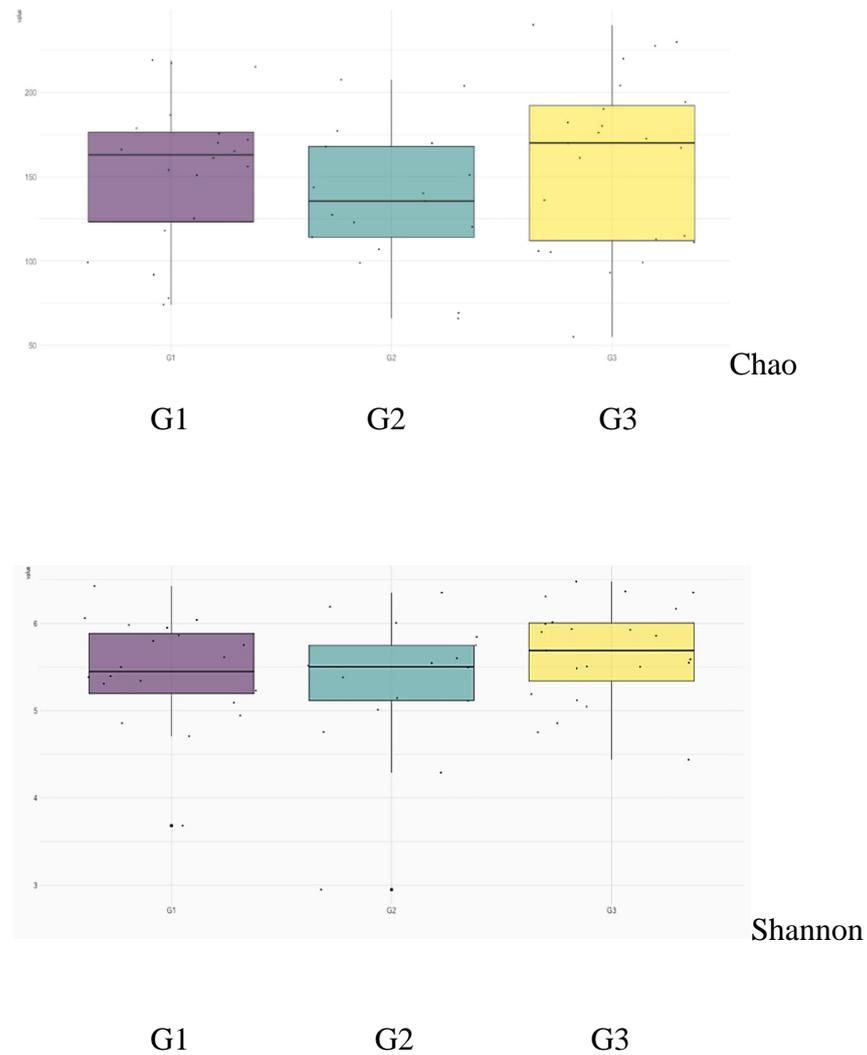


Figura 5 - Comparação dos grupos segundo diversidade alfa

6.3 Diversidade beta

A disposição dos resultados em gráfico de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) demonstra ausência de agrupamento (clusterização), com evidente sobreposição das elipses representativas dos três grupos. O teste estatístico corroborou a não distinção dos grupos também através deste parâmetro de diversidade (Figura 6).

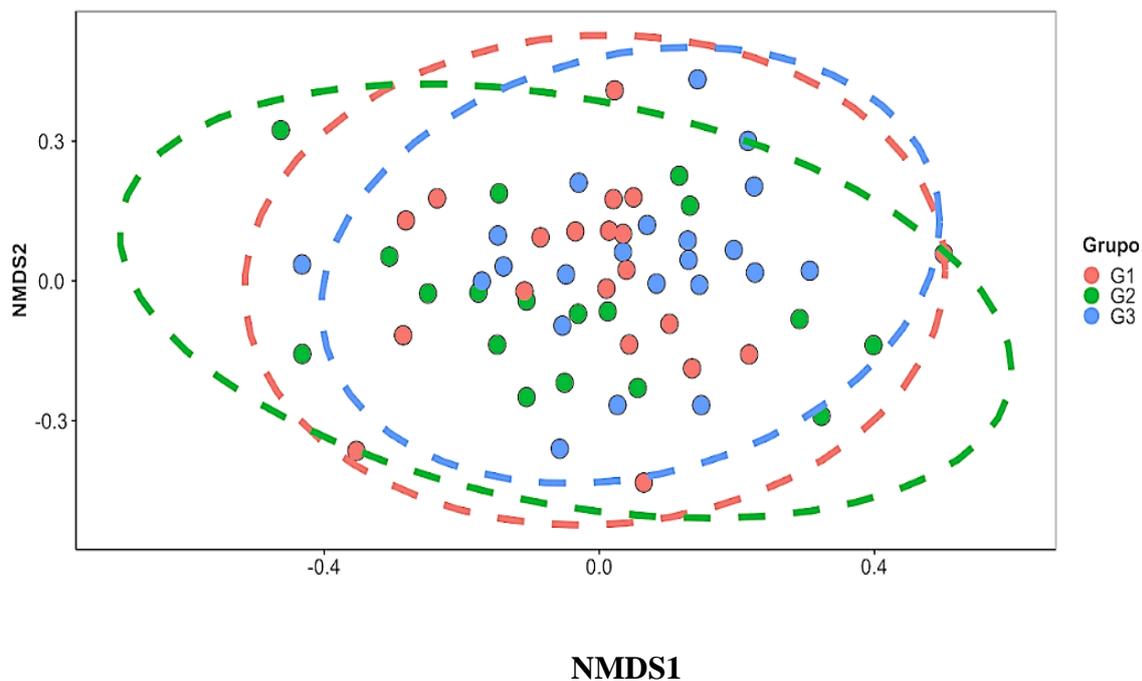


Figura 6 - Comparação dos grupos segundo diversidade beta, utilizando o índice de Bray-Curtis

6.4 Abundância relativa e composição taxonômica

A composição bacteriana, quando comparada entre os três grupos, não variou a nível de filo, classe, ordem e família. Destacamos que o filo com maior abundância relativa na maioria das amostras dos três grupos foi Firmicutes. Em um participante houve grande abundância relativa do filo Verrucomicrobiota e em outros dois participantes se observou grande abundância relativa do filo Actinobacteriota, ambas pertencentes ao Grupo 1 (Figuras 7, 8, 9 e 10). A alta composição de desses filios nas amostras destacadas aconteceram pela presença dos grupos *Akkermansiaceae* e *Bifidobacteriaceae*, respectivamente (Figura 10).

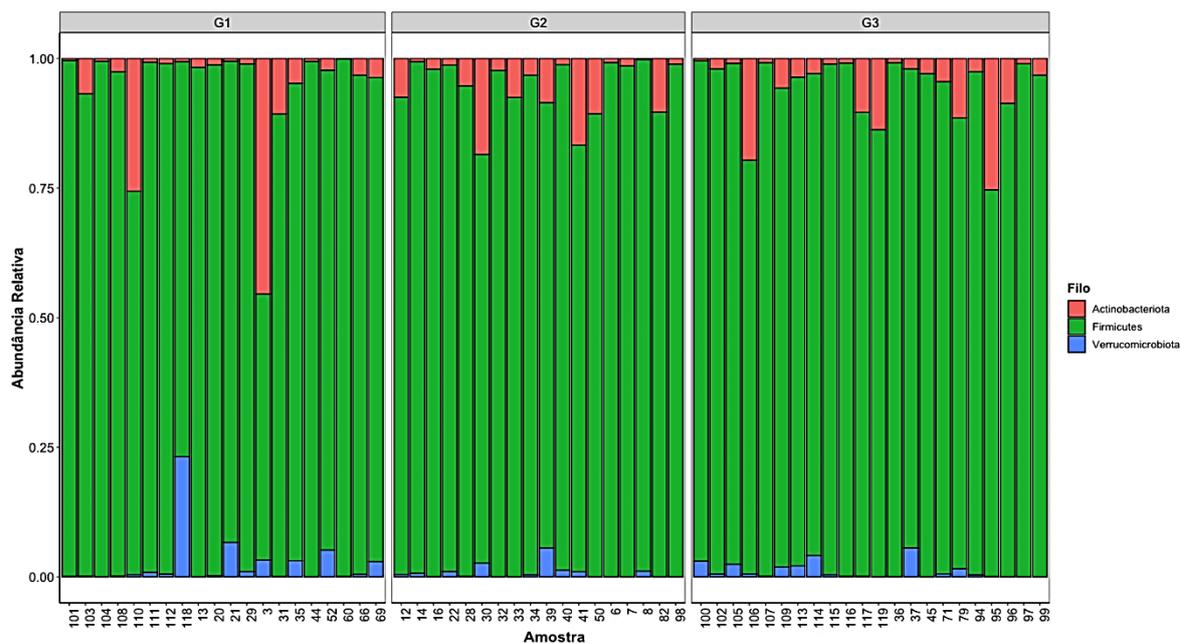


Figura 7 - Abundância relativa dos filios bacterianos nos três grupos de participantes



Figura 8 - Abundância relativa das classes bacterianas nos três grupos de participantes

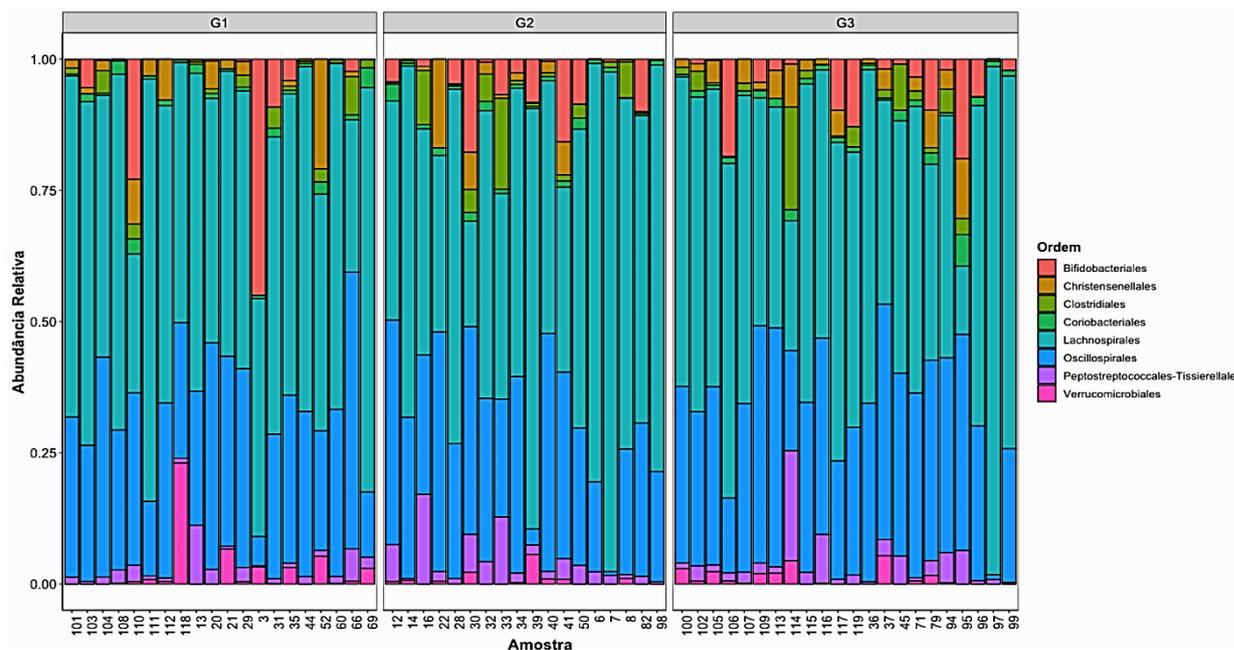


Figura 9 - Abundância relativa das ordens bacterianas nos três grupos de participantes

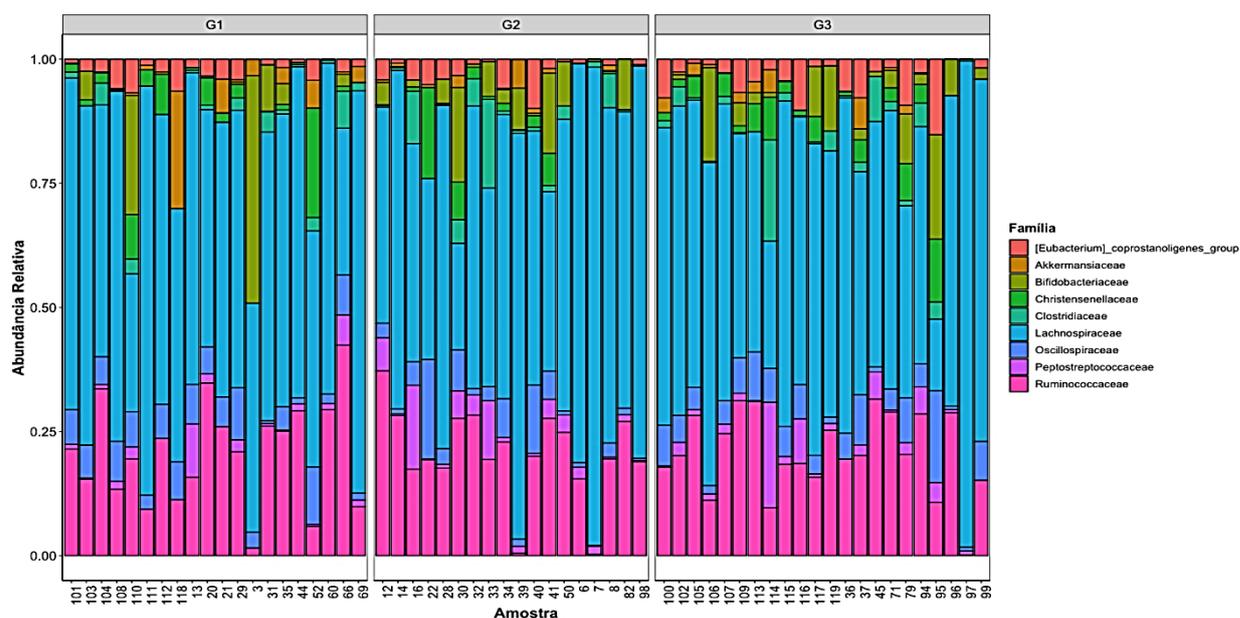


Figura 10 - Abundância relativa das famílias bacterianas nos três grupos de participantes

Os grupos 1 e 2 apresentaram os gêneros bacterianos *Streptococcus*, *Lachnospiraceae* UCG-003 e *Sellimonas* diferencialmente abundantes quando comparados ao grupo controle (G3). Enquanto G3 apresentou maior abundância relativa de *Methanosphaera* (Figura 11).

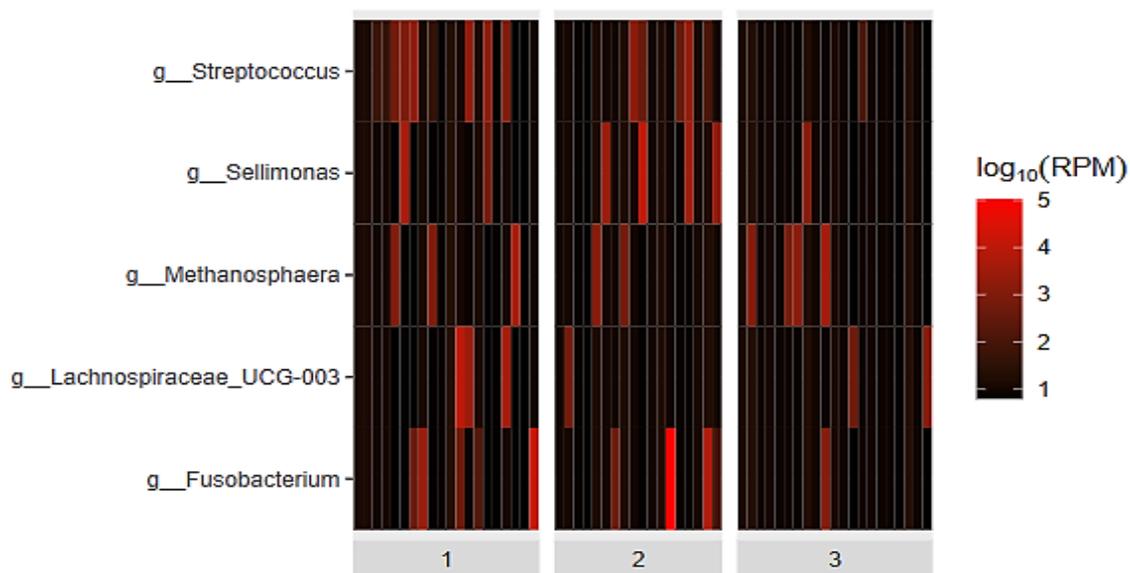


Figura 11 - Abundância relativa em nível de gênero bacteriano nos três grupos de pacientes estudados (*heat map*)

Finalmente, não foi observado um microbioma central (core microbioma) tanto para o grupo saudável, quanto para o grupo de doentes. Porém, observamos que de todas as amostras (G1+G2+G3), 65% delas apresentam a mesma ASV (*Amplicon sequence variant*) pertencente ao gênero *Dorea*.

6.5 Correlação com exames complementares

6.5.1 Questionário clínico (GSRs)

Os escores obtidos através das respostas deste questionário permitiram categorizar os participantes dos três grupos segundo intensidade e frequência dos sintomas gastrointestinais. Composto de 15 perguntas, as oito primeiras questões abrangem sintomas relacionados ao trato digestivo alto, enquanto nas perguntas de 9 a 15 são abordados sintomas relacionados ao trato digestivo baixo.

Nas figuras seguintes (Figuras 12 e 13) são apresentadas as correlações entre o escore global, referente às respostas das 15 questões, e os dados encontrados no microbioma. Entre os pacientes mais sintomáticos foi encontrada maior abundância

relativa dos gêneros *Eisenbergiella* e *Hungatella*. Já entre os pacientes menos sintomáticos destaca-se *Methanosphaera* (Figura 12).

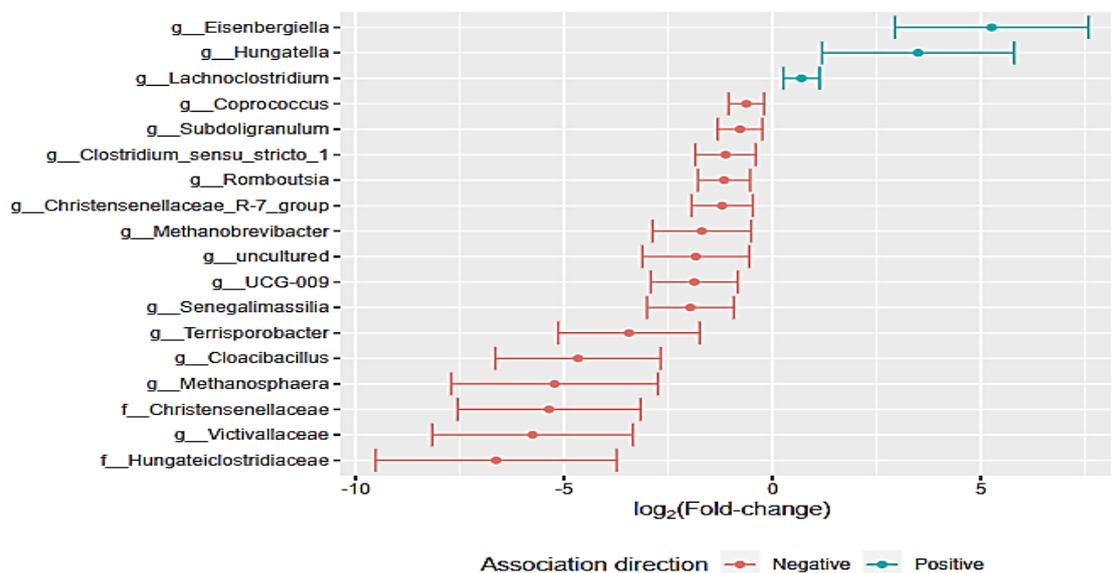


Figura 12 - Correlação entre sintomas gastrointestinais gerais e abundância relativa dos táxons bacterianos

Quando houve enfoque em sintomas como alternância de frequência evacuatória e constipação intestinal (questões de 9 a 15) foi identificado maior abundância do gênero *Hungatella*, agora acompanhada pelo gênero *Sellimonas*. Assim como o escore global, no escore direcionado para o trato digestivo baixo também foi encontrada maior abundância do táxon *Methanosphaera* naqueles menos sintomáticos (Figura 13).

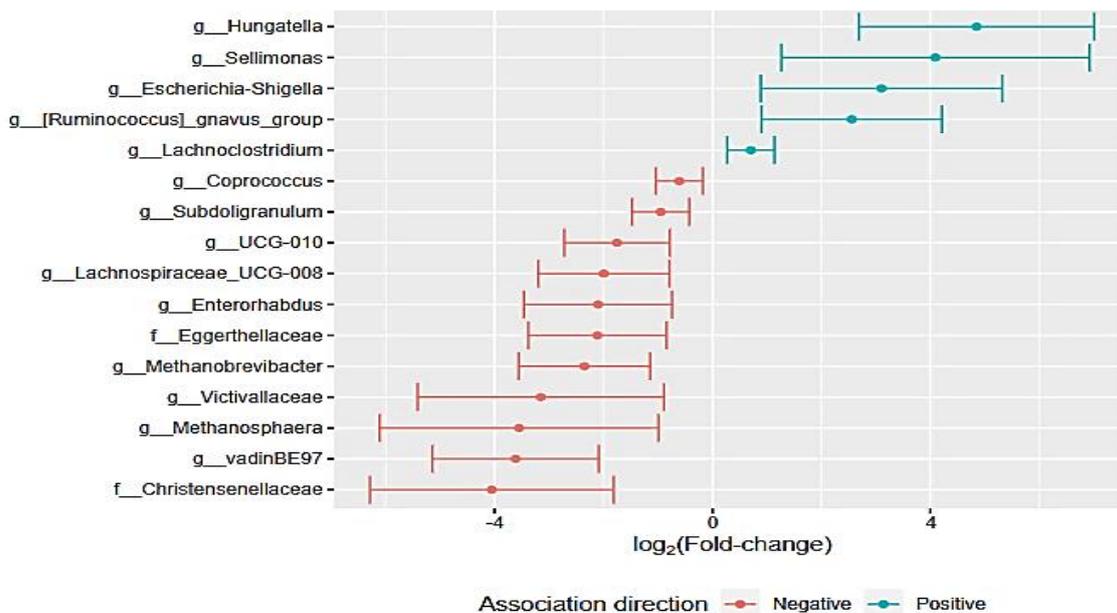


Figura 13 - Correlação entre sintomas intestinais baixos e abundância relativa dos táxons bacterianos

A partir deste ponto os resultados se referem sempre aos pacientes pertencentes aos grupos G1 e G2.

6.5.2 Marcadores laboratoriais: BNP e troponina

Na Figura 14 é possível observar a correlação entre abundância de gêneros e níveis de troponina. Nota-se maior abundância dos gêneros *Intestinimonas*, *Butyricocccaceae* e *Streptococcus* entre os pacientes com maiores níveis de troponina I. Já para participantes com maiores níveis circulantes de BNP houve associação ao gênero *Hungatella*, enquanto *Lachnospiraceae* UCG- 003 esteve associado a pacientes com menores níveis de BNP (Figura 15).

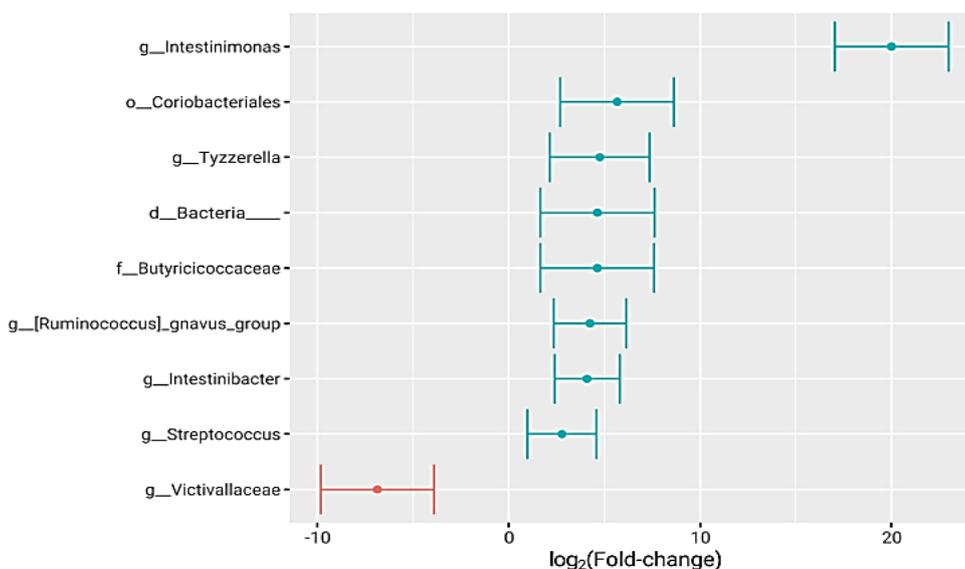


Figura 14 - Correlação entre níveis de troponina I e abundância relativa dos táxons bacterianos

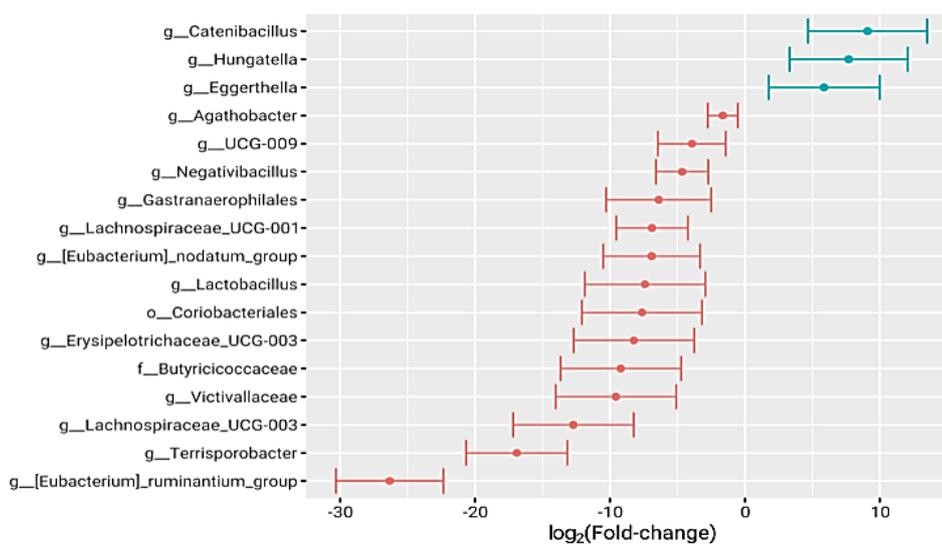


Figura 15 - Correlação entre níveis de BNP e abundância relativa dos táxons bacterianos

6.5.3 Parâmetros ecocardiográficos

Para correlação com volume do átrio esquerdo (VAE) destaca-se maior abundância relativa de *Lachnospiraceae* UCG-003 entre pacientes com volumes atriais menores e *Lachnospiraceae* NK4B4 naqueles com maiores átrios (Figura 16). Em pacientes com maior índice de massa cardíaca foi possível identificar maior abundância relativa de *Butyricocccaceae* (Figura 17).

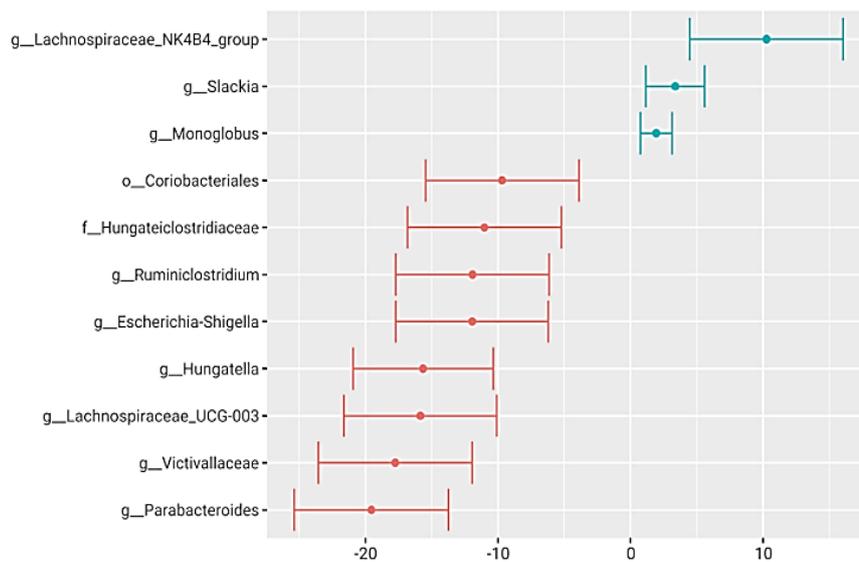


Figura 16 - Correlação entre VAE e abundância relativa dos táxons bacterianos

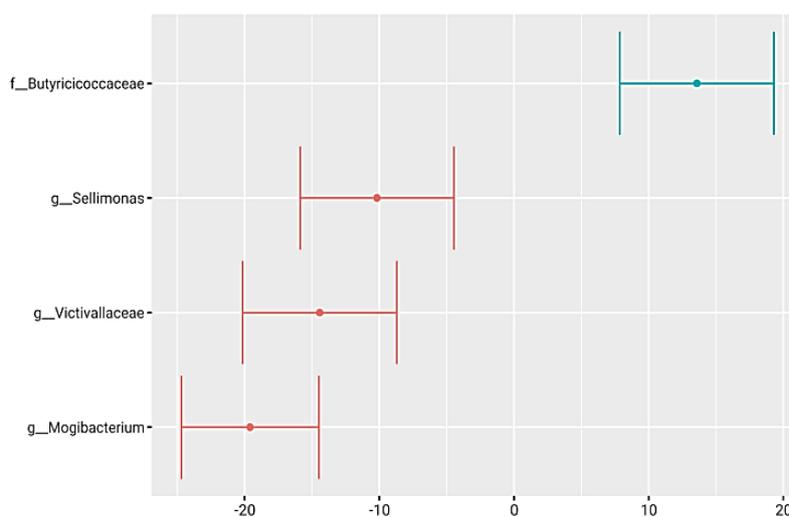


Figura 17 - Correlação entre índice de massa cardíaca e abundância relativa dos táxons bacterianos

6.5.4 Genótipo

Entre os pacientes com o teste genético alterado (portadores da forma ATTRh) *Instestinimonas* aparece como gênero mais abundante (Figura 18). Já *Lachnospiraceae* NK4B4, mais abundantemente presente naqueles pacientes com maiores volumes atriais, aparece aqui mais frequente naqueles pacientes com a forma ATTRw.

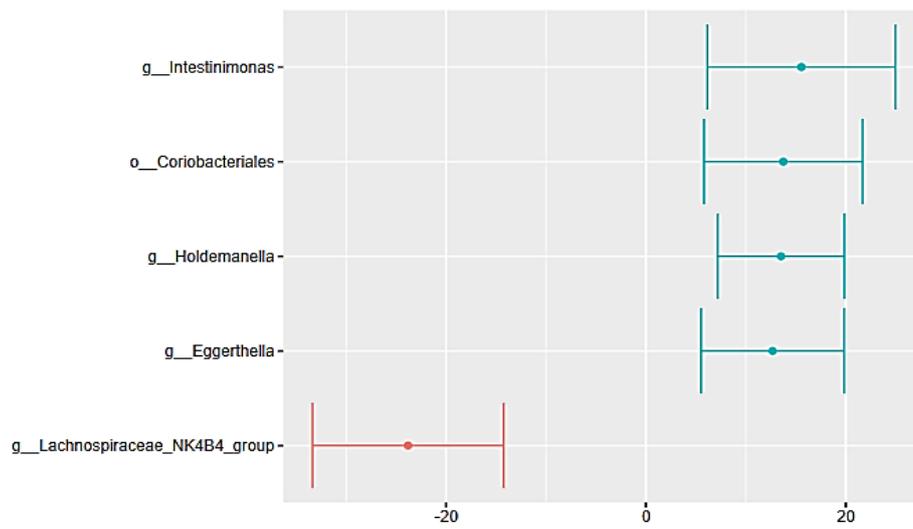


Figura 18 - Correlação entre genótipo dos pacientes e abundância relativa dos gêneros bacterianos

6.5.5 TC6M

O gênero *Intestinimonas* também aparece como o mais abundante em pacientes que percorreram menores distâncias no teste de caminhada de 6 minutos. Desta forma, o clado foi relacionado àqueles com pior desempenho físico (Figura 19).

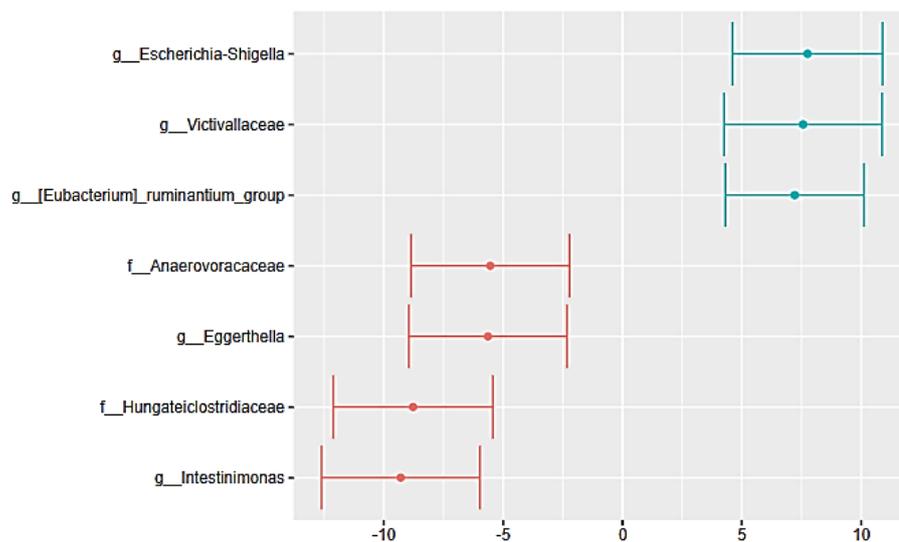


Figura 19 - Correlação entre TC6M e abundância relativa dos gêneros bacterianos

A figura 20 sumariza os principais achados. Em vermelho estão representadas as associações negativas, enquanto em verde estão representadas as associações positivas das variáveis analisadas.

	<i>Streptococcus</i>	<i>Sellimonas</i>	<i>Metanosphaera</i>	<i>Lachnospiraceae</i> UCG003	<i>Lachnospiraceae</i> NK4B4	<i>Fusobacterium</i>	<i>Hungatella</i>	<i>Intestinimonas</i>	<i>Butyrivibrionaceae</i>
G1									
G2									
G3									
Síntomas GI									
Troponina									
BNP									
VAE									
Massa VE									
Genótipo +									
TC6M									

Figura 20 - Sumário das associações entre as variáveis analisadas

7. DISCUSSÃO

Neste estudo encontramos grupos bacterianos diferencialmente abundantes nos grupos 1 e 2 de portadores da ATTR. De outro modo, em que pese o teste estatístico negativo, destacamos que, qualitativamente, os índices de diversidade alfa também foram menores entre os doentes.

Diversidade e composição do microbioma intestinal nos pacientes estudados

Caracterizar as diversidades alfa e beta do microbioma intestinal é fundamental para se determinar a complexidade e a variabilidade de um ecossistema microbiano. Esses resultados fornecem informações sobre a saúde gastrointestinal do indivíduo e podem orientar tratamentos específicos como a modulação microbiana por meio de probióticos, prebióticos e transplante fecal (20).

Nossas análises indicaram que os índices de alfa diversidade Chao (26) e Shannon (27) foram superiores no grupo controle. Apesar do teste estatístico apresentar valores de $p > 0,05$, qualitativamente foi observado que indivíduos saudáveis apresentam maior diversidade bacteriana, corroborando os dados disponíveis na literatura (28).

Em relação à composição taxonômica, os grupos não apresentaram uma clara separação entre as amostras de indivíduos saudáveis e doentes, quando comparados em âmbitos de filo, classe, ordem e família. Nos três grupos de participantes o filo mais abundante foi Firmicutes, corroborando parcialmente estudos que mostraram que a composição do microbioma fecal de mamíferos é composto majoritariamente de Bacteroidetes e Firmicutes (29).

Um participante apresentou grande quantidade de *Akkermansiaceae* e outros dois uma grande quantidade *Bifidobacteriaceae* (todos pertencentes ao Grupo 1). Estes gêneros são relatados na literatura como probióticos e sua presença pode estar relacionada ao hábito alimentar particular de cada indivíduo.

Dado que os pacientes do grupo controle compartilhavam hábitos alimentares similares aos pacientes doentes, é possível construir a hipótese de que dos níveis de filo a família, o padrão dietético prevalece sobre a influência de morbidades como amiloidose na determinação do microbioma intestinal, concordando com os resultados de estudos anteriores (30).

A busca por um *core microbiome* ou “microbioma central” tem sido amplamente aplicada a comunidades microbianas taxonomicamente definidas, identificando grupos de bactérias que são particularmente prevalentes nas populações hospedeiras (31,32). De modo geral, o microbioma central refere-se a qualquer grupo de táxons bacterianos que são característicos do hospedeiro. Apesar da popularização do termo e crescente uso, há pouco consenso sobre como realmente quantificar o *core microbiome* (33).

Neste estudo, consideramos o microbioma central em nível de ASVs, em duas situações: a) presente em todos os indivíduos do grupo, e b) presente em 65% dos indivíduos do grupo. Observamos ausência do microbioma central para G1, G2, G1+G2 e G3, porém encontramos um *core* microbioma de 65% da ASV pertencente ao gênero *Dorea*.

Com o aumento da resolução do escrutínio das amostras foi possível identificar padrões de gêneros bacterianos diferencialmente abundantes entre os grupos de doentes e o grupo controle. Os grupos 1 e 2 apresentaram os gêneros bacterianos *Streptococcus*, *Lachnospiraceae_UCG-003* e *Sellimonas* diferencialmente abundantes quando comparados ao grupo controle (G3). Enquanto G3 apresentou abundância relativa maior de *Methanosphaera*.

Destaca-se que a presença de diarreia persistente por mais de duas semanas foi fator de exclusão do estudo e que os três grupos de pacientes analisados não apresentaram sintomatologia intestinal ou índice de massa corpórea discrepantes no período da coleta das amostras ($p > 0,05$). Portanto, as diferenças encontradas neste estudo muito possivelmente já ocorrem em estágios iniciais, o que pode abrir uma janela de oportunidade para investigações futuras na procura de novas ferramentas diagnósticas para a identificação precoce do acometimento intestinal pela amiloidose, uma vez que o cenário ainda é desafiador com os exames disponíveis atualmente (34).

Correlação entre os táxons mais abundantes e avaliações complementares

- *Streptococcus*

A associação entre *Streptococcus* e doenças cardíacas é fartamente pesquisada, particularmente no cenário da febre reumática e da endocardite infecciosa (35). *S. viridans*, por exemplo, é um dos principais patógenos associados a essa condição, especialmente em pacientes com doenças cardíacas preexistentes ou próteses valvares

(36) . Já *S. bovis* é reconhecido por se associar a câncer de cólon e endocardite (37). Neste estudo, o gênero *Streptococcus* esteve associado ao grupo de pacientes doentes com e sem cardiopatia (G1 e G2) e altos níveis de troponina.

- *Sellimonas*

Sellimonas é um gênero de bactérias do filo Firmicutes, que tem atraído atenção crescente nas pesquisas sobre microbioma devido ao seu potencial impacto na saúde humana, incluindo possíveis correlações com doenças cardiovasculares. A associação do gênero *Sellimonas* com doenças cardiovasculares tem sido explorada em trabalhos recentes, particularmente no contexto de endocardite. Em estudo de randomização mendeliana bidirecional para investigar a relação causal entre microbiota intestinal e endocardite, concluiu-se que o gênero *Sellimonas*, entre outros microrganismos, desempenha um papel protetor contra a endocardite (38). No presente estudo, o gênero esteve mais abundante em pacientes do grupo 2 e sintomas gastrointestinais baixos mais intensos (alternância da frequência evacuatória e constipação).

- *Methanosphaera*

O gênero *Methanosphaera* é um grupo de archaeas metanogênicas presentes no intestino humano e animal. Estudos recentes têm explorado a relação entre esses microrganismos e várias condições de saúde, incluindo doenças cardiovasculares. No entanto, a associação exata entre *Methanosphaera* e as doenças cardiovasculares ainda não é totalmente compreendida. Algumas pesquisas sugerem que espécies metanogênicas de archaea, como *M. stadtmannae*, possam estar envolvidas no desenvolvimento de doenças sistêmicas como a obesidade e câncer intestinal (39). Neste estudo o gênero *Methanosphaera* foi diferencialmente mais abundante nos participantes controles (G3) e de modo coerente, esteve associada a menor escore de sintomas gastrointestinais.

O gênero *Intestinimonas* apresentou maior abundância relativa naqueles pacientes com maiores níveis de troponina, genótipo alterado e pior desempenho no teste de caminhada. Como na população estudada a apresentação genotípica mais prevalente naqueles pacientes com a forma ATTRh (85%) foi Val142Ile (52,9%), mais comumente causadora de cardiopatia (26), nota-se a coerência interna deste resultado.

Hungatella esteve mais abundantemente presente naqueles pacientes com maiores níveis de BNP e sintomas intestinais mais intensos, sendo esta associação bastante plausível à luz do reconhecimento dos graus variados de edema e hiperperfusão a que os intestinos ficam expostos em cenário de IC (12).

Também de modo coerente, *Butyricocchaceae* esteve mais associada a pacientes com maiores níveis de troponina e índice de massa cardíaca.

Curiosamente *Lachnospiraceae* UCG003, associada a pacientes com acometimento cardíaco (G1), esteve paradoxalmente mais relacionada a menores níveis de BNP e menores volumes do átrio esquerdo.

Possíveis limitações

Para aperfeiçoar futuras investigações, possíveis limitações devem ser consideradas. Houve diferença significativa na distribuição entre sexo masculino e feminino entre doentes e grupo controle. Como se buscou participantes controles com mesmo padrão dietético dos doentes, aleatoriamente foram recrutadas mais as esposas, dado que 15% dos pacientes possuíam a forma ATTRh (*wild type*) e neste estrato de pacientes predomina o sexo masculino (40).

É possível que muitos pacientes do grupo 2 ainda venham a apresentar acometimento cardíaco na evolução da doença, o que torna instigante a análise do microbioma intestinal em uma coorte longitudinal destes pacientes a procura de alterações dinâmicas que forneçam informações adicionais do processo de desenvolvimento da cardiopatia. Por último, as conclusões deste estudo são oriundas de dados que permitem estabelecer associações. Metodologias complementares mais abrangentes como a metagenômica *shotgun* poderão contribuir para o eventual estabelecimento de nexos causais entre ATTR e microbioma intestinal.

8. CONCLUSÃO

Observamos que pacientes com amiloidose transtirretina tanto com a forma cardíaca, bem como os pacientes sem evidência de comprometimento cardíaco apresentaram um perfil de microbioma intestinal distinto quando comparado ao grupo controle. Houve correlações com genótipo, intensidade dos sintomas gastrointestinais, biomarcadores de insuficiência cardíaca, parâmetros ecocardiográficos e teste de caminhada de seis minutos.

ANEXO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa – “Análise do microbioma intestinal de pacientes com amiloidose transtirretina – AMIAT”

Pesquisador principal – Prof. Dr. Fábio Fernandes

Departamento/Instituto – Unidade Clínica de Miocardiopatias

O(A) senhor(a) ou seu familiar está sendo convidado(a) a participar do estudo “Análise do microbioma intestinal de pacientes com amiloidose transtirretina”.

Gostaríamos de fornecer mais informações antes que o(a) senhor(a) decida participar. Um dos médicos irá explicar os objetivos do estudo detalhadamente e esclarecer o motivo pelo qual o(a) senhor(a) ou seu familiar está sendo convidado. A participação neste estudo é absolutamente voluntária e, caso aceite participar, o(a) senhor(a) receberá uma via assinada deste documento, que contém todas as explicações.

Por favor, leia as informações com atenção e fique à vontade para fazer perguntas. O(A) senhor(a) poderá discutir com familiares, com amigos ou com o seu médico, antes de fornecer o seu consentimento.

O(A) senhor(a) tem pleno direito de se recusar a participar do estudo. Se optar por retirar o seu consentimento do estudo após ter aceitado participar, tem o direito de fazer isso a qualquer momento. Caso decida sair do estudo, o(a) senhor(a) deverá avisar o médico ou a equipe do estudo. Eles garantirão que os procedimentos apropriados sejam seguidos e que seja realizada uma visita final para sua segurança. Independentemente de sua decisão, a relação com o seu médico ou seu tratamento nesta instituição não serão afetados.

O médico poderá retirá-lo do estudo se:

- a) Sua permanência no estudo for prejudicial à sua saúde;
- b) O(a) senhor(a) precisar de outro tratamento que não é permitido neste estudo;
- c) O(a) senhor(a) não seguir as instruções deste estudo;

- d) Caso o médico responsável decida interromper/cancelar o estudo, isto somente acontecerá após a avaliação e aprovação dos motivos dessa interrupção/cancelamento pelo Comitê de Ética em Pesquisa que o aprovou.

Qual é o número de participantes no estudo e qual é a duração de minha participação?

Esperamos recrutar 60 participantes neste estudo. A duração prevista de sua participação é de 6 meses.

Quais são as intervenções e procedimentos do estudo?

Se o(a) senhor(a) ou o seu familiar decidir participar desta pesquisa, você terá que comparecer ao hospital para realizar alguns exames para avaliar a sua saúde. Os exames são os seguintes:

- Exames de laboratório: durante este exame, o seu sangue será coletado utilizando uma seringa com agulha. Depois disso, as amostras de sangue serão analisadas no laboratório e poderão trazer mais informações sobre a sua saúde;
- Exame de fezes: para este exame, após lavar as mãos, o(a) senhor(a) deverá coletar as fezes em sua residência, utilizando um recipiente específico, evitando contato com as superfícies e o líquido do vaso sanitário. Após a coleta, o recipiente com a amostra de fezes deverá ser armazenado na geladeira até sua próxima consulta;
- Exame genético: para este exame, será utilizada a amostra de fezes que o(a) senhor(a) coletou em sua residência. As informações genéticas das bactérias que habitam o seu intestino serão analisadas;
- Questionário: o(a) senhor(a) responderá a um questionário específico sobre perda de peso, hábito intestinal (frequência de defecações), presença de incontinência fecal (incapacidade de controlar a eliminação das fezes), náuseas, vômitos e plenitude gástrica (sensação de satisfação alimentar);
- Elastografia cardíaca: o(a) senhor(a) precisará se deitar e o médico, utilizando um aparelho de ultrassom e um gel que facilita a visualização das estruturas do coração, irá avaliar o nível de rigidez do seu coração;
- Cintilografia cardíaca: para este exame, será injetada uma medicação por uma veia para facilitar a visualização das estruturas do seu corpo. O exame será realizado de uma a três horas após a medicação ter sido injetada e dura cerca de

30 minutos. Depois disso, o(a) senhor(a) se deitará em uma cama para que o equipamento consiga captar as imagens do seu corpo;

- PET-RM: o preparo para este exame é parecido com a cintilografia, onde será injetada uma medicação para facilitar a visualização das estruturas do seu corpo. O exame será realizado uma hora após a medicação ter sido injetada, e dura cerca de 30 a 60 minutos. Então, o(a) senhor(a) se deitará em uma cama para que o equipamento consiga captar as imagens do seu corpo. Nesse momento, o(a) senhor(a) deve permanecer deitado e sem se mover. Essa avaliação serve para obter informações detalhadas do seu coração;
- Eletrocardiograma: durante este procedimento, o médico pedirá para o(a) senhor(a) se deitar e serão colocados sensores no seu peito para registrar a atividade elétrica do seu coração na superfície do seu tórax;
- Ecocardiograma: para este exame, o(a) senhor(a) precisará se deitar e o médico, utilizando um aparelho de ultrassom e um gel que facilita a visualização das partes do coração, poderá avaliar o tamanho e a função das diferentes regiões do seu coração;
- Teste de caminhada de 6 minutos: este procedimento será realizado em um corredor, no qual o(a) senhor(a) irá andar por 6 minutos, enquanto o médico ou um membro da equipe contará a distância percorrida. Este exame serve para avaliar o quanto o(a) senhor(a) consegue andar e quão cansado(a) o(a) senhor(a) se sente durante e após o exercício.

Quais são as minhas responsabilidades?

Se o(a) senhor(a) concordar em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) virá ao hospital para realizar o exame de laboratório e entregar a amostra de fezes coletada em sua residência, e passará em consulta médica.

Quais são os possíveis riscos de participar neste estudo?

Durante a coleta de sangue pode haver uma pequena dor ou desconforto no local da punção da agulha e ocasionalmente uma mancha roxa no local que desaparecerá em alguns dias.

O eletrocardiograma pode causar discreta irritação na pele pelo contato do sensor preso com adesivo, caso tenha alergia ou pele sensível.

Em relação ao ecocardiograma e à elastografia cardíaca, que são exames de ultrassom feito para avaliação do coração, não há exposição à radiação, não há dor

significativa, não há necessidade de medicação, sendo exame habitualmente rápido. Porém, pode haver um leve desconforto pela colocação de gel de condução e pela pressão do aparelho de ultrassom no peito.

O teste de caminhada de 6 minutos é um exame não invasivo. Porém, o(a) senhor(a) poderá sentir cansaço no momento da caminhada devido ao esforço físico. Durante a realização do exame de fezes, pode haver desconforto para coletar as mesmas.

Quais são os possíveis benefícios de participar neste estudo?

Ao participar da pesquisa, o(a) senhor(a) terá como benefício um acompanhamento médico mais rigoroso, já que terá uma equipe dedicada à avaliação da sua saúde.

Serei compensado por danos relacionados ao estudo?

Espera-se que a sua participação no estudo não cause qualquer problema de saúde. No entanto, caso venha, eventualmente, a ocorrer algum problema ou caso o(a) senhor(a) venha a sofrer qualquer lesão que possa ser caracterizada como resultante da sua participação neste estudo, o(a) senhor(a) irá receber o devido tratamento médico, sem arcar com quaisquer custos referentes a estas possíveis doenças ou lesões.

O(a) senhor(a) não estará abrindo mão de quaisquer direitos na forma da lei ao assinar o presente termo de consentimento.

O(a) senhor(a) deverá informar quaisquer lesões que ocorram durante o período do estudo à equipe do estudo. Além disso, o(a) senhor(a) também pode entrar em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

Serei pago ou reembolsado para participar deste estudo?

Sua participação será isenta de despesas pessoais em qualquer etapa do estudo, incluindo exames e consultas. Também não existirá compensação financeira relacionada à sua participação. Qualquer despesa adicional, como transporte ou alimentação, para realização das visitas do estudo será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Quem terá acesso aos meus registros médicos? Minhas informações são confidenciais?

Este estudo só pode ser realizado através da coleta e uso das suas informações clínicas. Os registros da sua participação neste estudo serão mantidos sob sigilo e

confidencialidade. Serão acessados de forma restrita, apenas por pessoas ligadas ao estudo (pesquisadores), que irão transferir suas informações clínicas para formulários eletrônicos (que não possuem informações que possam identificá-lo) e verificar se o estudo está sendo realizado apropriadamente. A confidencialidade e privacidade de todas as informações serão asseguradas. Seu nome não será identificado em nenhum relatório ou publicação do estudo.

Caso esteja de acordo, o seu médico particular será informado de sua participação no estudo. Os resultados do estudo serão divulgados, para fins acadêmicos e científicos, sem a identificação de nenhum dado que revele a identidade dos participantes.

Contato em caso de dúvidas ou emergência:

Caso aceite participar deste estudo, será necessário que o(a) senhor(a) e o pesquisador assinem duas vias deste documento, em todas as páginas. Nas primeiras páginas, a assinatura pode ser abreviada (rubrica).

O Investigador Principal deste estudo, médico do estudo, é **Prof. Dr. Fábio Fernandes**, que pode ser encontrado no seguinte endereço: Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – InCor – HCFMUSP – Avenida Doutor Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – Bloco 1 – 1º Andar – CEP: 05403-000, telefone: 2661-5057, e-mail: fabio.fernandes@incor.usp.br.

Em qualquer fase do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso ao investigador e sua equipe para comunicar qualquer desconforto, esclarecer dúvidas ou pedir informações adicionais.

Os Comitês de Ética em Pesquisa são colegiados interdisciplinares e independentes, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criados para garantir a proteção dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Se houver alguma dúvida ou necessitar algum esclarecimento adicional sobre seus direitos como participante de pesquisa ou sobre os aspectos éticos do estudo, entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP). Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, Fone: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Eu, _____,
fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre o questionário na qual responderei. Também foi garantido pelo pesquisador sigilo que assegure a minha privacidade dos dados obtidos na pesquisa. Li e compreendi os objetivos do estudo, todos os procedimentos que serão realizados e em caso de qualquer dúvida, poderei entrar em contato com a equipe do estudo. Estou ciente que ficarei com uma via deste documento.

_____ Nome do participante	
_____ _____/_____/_____	Data:
Assinatura do participante (ou do representante legal)	

_____ Nome da testemunha (se necessário)	
_____ _____/_____/_____	Data:
Assinatura da testemunha (se necessário)	

_____ Nome do pesquisador	
_____ _____/_____/_____	Data:
Assinatura do pesquisador	

REFERÊNCIAS*

1. Mohty D, Damy T, Cosnay P, Echahidi N, Casset-Senon D, Viot P, et al. Cardiac amyloidosis: Updates in diagnosis and management. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 1º de outubro de 2013;106(10):528–40.
2. Bhogal S, Ladia V, Sitwala P, Cook E, Bajaj K, Ramu V, et al. Cardiac Amyloidosis: An Updated Review With Emphasis on Diagnosis and Future Directions. *Current Problems in Cardiology*. 1º de janeiro de 2018;43(1):10–34.
3. Kelly JW, Colon W, Lai Z, Lashuel HA, Mcculloch J, Mccutchen SL, et al. Transthyretin Quaternary and Tertiary Structural Changes Facilitate Misassembly into Amyloid. Em: Richards FM, Eisenberg DS, Kim PS, organizadores. *Advances in Protein Chemistry* [Internet]. Academic Press; 1997 [citado 19 de junho de 2024]. p. 161–81. (Protein Misassembly; vol. 50). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323308603216>
4. Per Westermark, Knut Sletten, Bjorn Johansson, Gibbons G. Cornwell III. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. [Internet]. 1990 [citado 19 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.87.7.2843>
5. Jiang X, Buxbaum JN, Kelly JW. The V122I cardiomyopathy variant of transthyretin increases the velocity of rate-limiting tetramer dissociation, resulting in accelerated amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 18 de dezembro de 2001;98(26):14943–8.
6. Ruberg FL, Berk JL. Transthyretin (TTR) Cardiac Amyloidosis. *Circulation*. 4 de setembro de 2012;126(10):1286–300.
7. Rapezzi C, Merlini G, Quarta CC, Riva L, Longhi S, Leone O, et al. Systemic Cardiac Amyloidoses. *Circulation*. 29 de setembro de 2009;120(13):1203–12.
8. Suhr OB, Anan I, Åhlström KR, Rydh A. Gastric emptying before and after liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type (Val30Met). *Amyloid*. 1º de janeiro de 2003;10(2):121–6.
9. Guirl MJ, Högenauer C, Ana CSA, Porter JL, Little KH, Stone MJ, et al. Rapid Intestinal Transit As A Primary Cause of Severe Chronic Diarrhea in Patients With Amyloidosis. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. outubro de 2003;98(10):2219.
10. Ito T, Sakakibara R, Ito S, Uchiyama T, Liu Z, Yamamoto T, et al. Mechanism of Constipation in Familial Amyloid Polyneuropathy: a Case Report [Internet]. [citado 19 de junho de 2024]. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/45/20/45_20_1173/_article/-char/ja/
11. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Diagnóstico e Tratamento das Amiloidoses Hereditárias associadas à Transtirretina [Internet].

2018. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2018/relatorio_pcdt_paf_cp20_2018.pdf
12. Gallo A, Macerola N, Favuzzi AM, Nicolazzi MA, Gasbarrini A, Montalto M. The Gut in Heart Failure: Current Knowledge and Novel Frontiers. *Medical Principles and Practice*. 28 de janeiro de 2022;31(3):203–14.
 13. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. março de 2010;464(7285):59–65.
 14. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*. 1º de fevereiro de 2013;34(1):39–58.
 15. Lang JM, Eisen JA, Zivkovic AM. The microbes we eat: abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. *PeerJ*. 9 de dezembro de 2014;2:e659.
 16. Frédéric Raymond, Amin A Ouameur, Maxime Déraspe, Naeem Iqbal, Hélène Gingras, Bédís Dridi, et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics [Internet]. 2016 [citado 19 de junho de 2024]. Disponível em: <https://academic.oup.com/ismej/article/10/3/707/7538201?login=false>
 17. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 9 de junho de 2009;9(1):123.
 18. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EMM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterology & Motility*. 2013;25(1):4–15.
 19. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol*. outubro de 2017;15(10):630–8.
 20. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*. 2 de agosto de 2013;341(6145):569–73.
 21. Souza GS, Sardá FAH, Giuntini EB, Gumbrevicius I, Morais MB de, Menezes EW de. TRANSLATION AND VALIDATION OF THE BRAZILIAN PORTUGUESE VERSION OF THE GASTROINTESTINAL SYMPTOM RATING SCALE (GSRS) QUESTIONNAIRE. *Arq Gastroenterol*. setembro de 2016; 53:146–51.
 22. FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. 2010.
 23. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. agosto de 2019;37(8):852–7.

24. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. julho de 2016;13(7):581–3.
25. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 1º de janeiro de 2013;41(D1):D590–6.
26. Anne Chao. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. Em: *Scandinavian Journal of Statistics* [Internet]. 1984. p. 265–70. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/4615964>
27. Shannon CE. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*. 1948;27(3):379–423.
28. Manor O, Dai CL, Kornilov SA, Smith B, Price ND, Lovejoy JC, et al. Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nat Commun*. 15 de outubro de 2020;11(1):5206.
29. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*. maio de 2020;12(5):1474.
30. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*. 1º de fevereiro de 2019;76(3):473–93.
31. Muletz-Wolz CR, Fleischer RC, Lips KR. Fungal disease and temperature alter skin microbiome structure in an experimental salamander system. *Molecular Ecology*. 2019;28(11):2917–31.
32. Risely A. Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *Journal of Animal Ecology*. 2020;89(7):1549–58.
33. Neu AT, Allen EE, Roy K. Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 21 de dezembro de 2021;118(51):e2104429118.
34. null null, Kittleson MM, Ruberg FL, Ambardekar AV, Brannagan TH, Cheng RK, et al. 2023 ACC Expert Consensus Decision Pathway on Comprehensive Multidisciplinary Care for the Patient With Cardiac Amyloidosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 21 de março de 2023;81(11):1076–126.
35. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*. novembro de 2005;5(11):685–94.
36. Cunningham MW. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. julho de 2000;13(3):470–511.
37. Gupta A, Madani R, Mukhtar H. *Streptococcus bovis* endocarditis, a silent sign for colonic tumour. *Colorectal Disease*. 2010;12(3):164–71.

38. Mengyue Yang, Wen Bi, Zhijie Zhang. Gut microbiota and risk of endocarditis: a bidirectional Mendelian randomization study. *Frontiers Microbiol* [Internet]. 2024 [citado 19 de junho de 2024];15(*Sec. Microorganisms in Vertebrate Digestive Systems*). Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1320095/full>
39. Chaudhary PP, Conway PL, Schlundt J. Methanogens in humans: potentially beneficial or harmful for health. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1º de abril de 2018;102(7):3095–104.
40. Simões MV, Fernandes F, Marcondes-Braga FG, Scheinberg P, Correia E de B, Rohde LEP, et al. Posicionamento sobre Diagnóstico e Tratamento da Amiloidose Cardíaca – 2021. *Arq Bras Cardiol*. 20 de setembro de 2021;117:561–98.

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.