



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para avaliação no **Edital Nº 4/2022**.

Título do projeto: Diversidade inexplorada na pele humana: análise da prevalência de fungos não caracterizados em dados de metagenômica.

Palavras-chave do projeto: Microbiota; *Malassezia*, Sequenciamento de segunda geração; ITS1; Disbiose.

Área do conhecimento do projeto: Ciências Biológicas, Microbiologia.

Sumário

Resumo	2
1. Introdução e Justificativa	3
2. Objetivos	6
3. Metodologia	6
4. Resultados preliminares	8
5. Viabilidade	9
6. Cronograma de atividades	9
7. Referências	11

Resumo

Microbiota humana refere-se ao conjunto de microrganismos que habitam os diferentes órgãos e tecidos de nosso corpo e desempenham diversos papéis fundamentais para a homeostase. Por outro lado, a disbiose destas comunidades pode estar envolvida no desenvolvimento de doenças. A comunidade bacteriana tem sido extensivamente estudada, enquanto a diversidade fúngica permanece pouco explorada. Doenças crônicas de pele foram historicamente atribuídas a fungos do gênero *Malassezia* com base em métodos dependentes de cultivo. Porém, estratégias de Biologia Molecular, em particular tecnologias de sequenciamento de segunda geração, mostram que esses organismos são abundantes também na pele saudável. Atualmente, o gênero inclui 18 espécies formalmente descritas, mas há evidências de organismos ainda não caracterizados com alta prevalência e abundância em amostras provenientes tanto de lesões cutâneas quanto de pele saudável. Dados metagenômicos são frequentemente analisados de maneira generalista, negligenciando sequências para as quais não há referência nas bases de dados, o que dificulta a detecção de possíveis novas espécies. Neste projeto, serão avaliadas a prevalência e abundância de sequências de organismos não caracterizados do gênero *Malassezia* em conjuntos de dados metagenômicos da microbiota fúngica cutânea, buscando correlações com diferentes estados de saúde e outras características dos voluntários. Primeiramente, será realizada uma revisão sistemática da literatura envolvendo análises metagenômicas da microbiota fúngica cutânea. Os dados de sequenciamento correspondentes aos trabalhos selecionados serão recuperados da base *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI a fim de avaliar a presença, prevalência e abundância de sequências pertencentes a possíveis novas espécies do gênero *Malassezia*. Por fim, serão realizadas análises estatísticas com os metadados disponíveis. Elucidar a diversidade de fungos do gênero *Malassezia* poderá contribuir para uma melhor compreensão da diversidade microbiana da pele e seu possível envolvimento na etiologia de doenças.

1. Introdução e Justificativa

O corpo humano é habitado por uma rica e diversa gama de microrganismos que, em conjunto, formam a chamada microbiota humana, a qual é composta por bactérias, fungos e arqueas adaptados às condições físicas e bioquímicas dos diferentes sítios que colonizam (Turnbaugh *et al.*, 2007). Estes organismos vivem de maneira integrada, constituindo uma rede ecológica profundamente intrincada e temporalmente estável, onde as relações estabelecidas podem ser investigadas a partir de princípios semelhantes àqueles utilizados no estudo de ecossistemas macroscópicos (Oh *et al.*, 2016). Integrantes destas comunidades são responsáveis por desempenhar funções essenciais relacionadas à manutenção da homeostase e biossíntese de moléculas importantes para o corpo humano (Clemente *et al.*, 2012), além da maturação e modulação do sistema imunológico (Mazmanian *et al.*, 2005).

Por outro lado, em determinadas condições, podem estar associados ao desenvolvimento de doenças. Alterações na composição da comunidade que a tornam diferente do que seria esperado, com base no conhecimento que se tem sobre a composição média para a população saudável, são chamadas de disbiose (Walker, 2017). A microbiota está em constante interação com células e proteínas do sistema imunológico, elicitando respostas particulares a partir de diferentes configurações da comunidade microbiana. Nesse sentido, situações de disbiose podem suscitar respostas inflamatórias associadas ao desenvolvimento de doenças (Rath *et al.*, 2018). A disbiose pode se dar através de um aumento na abundância relativa de espécies de potencial patogênico em detrimento de espécies que desempenham papel benéfico, alterações no padrão de interação entre diferentes microrganismos que resultam em uma maior secreção de moléculas pró-inflamatórias, perturbação e disfunção da barreira epitelial, entre outros processos (Elias, 2018; Catinean *et al.*, 2019; Bay *et al.*, 2021).

A pele é o maior órgão do corpo humano exerce o papel biológico de barreira contra agentes exógenos bióticos e abióticos potencialmente nocivos ao organismo (Salmon *et al.*, 1994). O papel modulatório da pele em relação ao sistema imune tem se mostrado fundamental para a compreensão de doenças relacionadas a reações de hipersensibilidade local e sistêmica. Sabe-se que a pele mantém uma comunicação muito próxima com o chamado eixo cérebro-intestino, sendo que estados de disbiose tanto da microbiota epitelial quanto da microbiota intestinal podem estar relacionados à ocorrência de doenças inflamatórias de pele e respostas imunes mediadas pela pele que acarretam em respostas inflamatórias sistêmicas (Catinean *et al.*, 2019; Widhiati *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2022).

Embora não representem, na maioria dos casos, ameaças diretas à sobrevivência, patologias crônicas que acometem a pele estão associadas a altos índices de sofrimento físico e psíquico, isolamento social e uma qualidade de vida precária (Pärna *et al.*, 2015). A pele constitui um fator social importante, no sentido de sua exposição e suscetibilidade a se tornar alvo de estigmas e discriminação. Portadores de doenças de pele crônicas reportam maior ocorrência de prejuízo ocupacional, além de morbidades psiquiátricas como depressão e ansiedade social, em relação a indivíduos de pele saudável (Hong *et al.*, 2008). Doenças como psoríase, dermatite atópica e dermatite seborreica podem ser consideradas comuns (Karimkhani *et al.*, 2017), e estão relacionadas à ocorrência de inflamação recorrente com manifestações clínicas como prurido, edema, eritema, dor, erupções cutâneas e descamação tecidual. Algumas destas doenças podem levar a lesões teciduais profundas, e os mecanismos fisiopatogênicos e imunológicos subjacentes à sua manifestação permanecem pouco

elucidados, dificultando o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficientes (Dessinioti *et al.*, 2013; Hadi *et al.*, 2021; Mihiu *et al.*, 2021).

Caracterizações da microbiota associada a condições de saúde e a diferentes estados patológicos têm contribuído para elucidar a natureza complexa e multifatorial subjacente à etiologia de diversas patologias crônicas, possibilitando a investigação de potenciais novas vias terapêuticas para promover o controle e remissão destas doenças e uma melhoria geral na qualidade de vida dos pacientes (Gebrayel *et al.*, 2022). Historicamente, os estudos da microbiota se deram a partir de métodos dependentes de cultivo (Ashbee, 2007). Essas abordagens têm muitas limitações, e podem levar a conclusões enviesadas acerca da composição das comunidades microbianas, dado que somente uma pequena quantidade de microrganismos pode ser cultivada (Ashbee, 2007; Jo *et al.*, 2017).

As tecnologias de sequenciamento nucleotídico de alto rendimento têm impulsionado um crescimento exponencial do volume de informações em bases de dados bio-moleculares (Reuter *et al.*, 2015). Coletivamente referidas como “sequenciamento de nova geração” (ou NGS, do inglês *next-generation sequencing*), tais tecnologias empregam ferramentas e recursos que possibilitam a síntese concomitante de múltiplos fragmentos de sequências nucleotídicas, diferindo-se fundamentalmente, portanto, do tradicional sequenciamento de Sanger, que consiste na adição progressiva de nucleotídeos a uma mesma fita contínua de DNA, sendo considerado um sequenciamento de baixo rendimento (Shendure *et al.*, 2008).

Linhas de investigação microbiológica que buscam caracterizar não somente a constituição genômica de um microrganismo, mas a composição de uma comunidade microbiana como um todo foram viabilizadas por estas tecnologias atreladas à técnicas de bioinformática (Reuter *et al.*, 2015; Bhat *et al.*, 2017). Assim, o conhecimento sobre a microbiota característica de diversos ambientes, assim como seus papéis fisiológicos e metabólicos quando residentes de um organismo hospedeiro, tem se expandido consideravelmente nos últimos anos (Turnbaugh *et al.*, 2007).

As tecnologias de NGS impõem, também, novas limitações. A caracterização de comunidades microbianas a partir de dados provenientes de NGS se dá, predominantemente, por meio de consultas a bases de dados biológicos, onde se encontram disponíveis sequências de referência pertencentes a um determinado organismo ou grupo de organismos - em outras palavras, dados previamente analisados, a partir dos quais são realizados alinhamentos em relação aos dados de interesse. Desta forma, pode-se dizer que a disponibilidade ou não de sequências nos bancos de dados constitui uma limitação significativa para a realização destas análises comparativas, podendo acarretar em vieses de análise que dificultam, em particular, a identificação de organismos para os quais não há referência nos bancos de dados (Schoch *et al.*, 2012; Khomich *et al.*, 2018).

A microbiota residente da pele tem sido extensivamente caracterizada quanto à sua composição bacteriana, sendo que dados sobre sua composição fúngica permanecem relativamente escassos (Khomich *et al.*, 2018). É sabido, no entanto, que leveduras do gênero *Malassezia* se destacam em termos de prevalência e abundância na microbiota fúngica da pele humana, tanto em amostras provenientes de doenças cutâneas quanto de pele saudável (Paulino *et al.*, 2006; Findley *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2016; Byrd *et al.*, 2018). Os organismos do gênero *Malassezia* são conhecidos por serem lipofílicos - sendo, majoritariamente, lipodependentes - e habitam comumente a pele de diferentes espécies endotérmicas, ocorrendo tipicamente em regiões da pele de maior disponibilidade lipídica, apesar de sua

presença já ter sido reportada em amostras provenientes de outros ambientes, como regiões marinhas e raízes vegetais (Amend, 2014; Findley *et al.*, 2013; Sparber *et al.*, 2017). A maior parte das espécies pode ser considerada fastidiosa, fazendo com que a diversidade destes organismos fosse historicamente pouco explorada (Ashbee, 2007; Jo *et al.*, 2017). Esta limitação tem sido superada, em partes, a partir da possibilidade da realização de análises independentes de cultivo (Bhat *et al.*, 2017). Ainda assim, análises mais detalhadas dos dados moleculares disponíveis são necessárias para acessar a real diversidade destes organismos, visto que há indícios de espécies ainda não caracterizadas (Soares *et al.*, 2016).

Historicamente, organismos do gênero *Malassezia* foram associados à ocorrência de doenças crônicas como a dermatite seborreica, a dermatite atópica e a psoríase, tendo sido apontados como agentes etiológicos diretos destas patologias (Marcon *et al.*, 1992; Bergrbrant *et al.*, 1994; Assaf *et al.*, 1996; Schmidt, 1997; Rolston, 2001). Entretanto, não é claro de que forma, exatamente, estes organismos estariam envolvidos na patogênese e quais condições estariam associadas a mudanças no seu papel ecológico (Gaitanis *et al.*, 2013; Chandra *et al.*, 2021; Abdillah *et al.*, 2021).

Atualmente, existem 18 espécies descritas aceitas como pertencentes ao gênero *Malassezia* (Guillot *et al.*, 2020), sendo *M. restricta* e *M. globosa* mais frequentemente apontadas como espécies predominantes na pele humana (Soares *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2016). Enquanto análises dependentes de cultivo historicamente indicaram *Malassezia furfur* como a espécie fúngica mais abundante e prevalente na microbiota cutânea, análises por NGS apontam baixíssima prevalência ou completa ausência desta espécie na maior parte das amostras (Ashbee, 2007; Zhang *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012; Findley *et al.*, 2013). Além disso, subgrupos e filotipos ainda não caracterizados e possivelmente representativos de novas espécies, também se mostraram prevalentes e abundantes (Paulino *et al.*, 2006; Paulino *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2016).

É evidente, portanto, que a detecção da presença e abundância de organismos do gênero *Malassezia* na pele não é suficiente para inferir causalidade em relação à evocação de doenças. Frente às tecnologias atuais, novos paradigmas emergem e reforçam a relevância de abordagens de investigação que analisam as comunidades fúngicas e relações ecológicas existentes dentro delas como um todo - assim como as relações estabelecidas entre comunidades fúngicas e bacterianas - a fim de compreender o papel da microbiota cutânea em relação à ocorrência de doenças crônicas de pele e regulação da resposta imune, possibilitando um esclarecimento quanto às possibilidades terapêuticas existentes (Peleg *et al.* 2010; Park *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2021).

Dada a alta prevalência e abundância de *Malassezia* na microbiota fúngica cutânea, considerar a forma como este gênero tem sido revisado na última década, além da recorrente identificação de sequências que sugerem a existência de possíveis novas espécies, torna evidente a necessidade de reaccessar estes dados. Análises direcionadas são necessárias a fim de elucidar a real prevalência destas possíveis novas espécies na microbiota da pele humana e, consequentemente, esclarecer a diversidade existente destes organismos. Tais resultados possibilitarão o desenvolvimento de conhecimentos acerca da interação destes organismos com outros integrantes da microbiota cutânea e com o hospedeiro (Wu *et al.*, 2015; Paulino, 2017).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a presença de organismos não caracterizados do gênero *Malassezia* em dados metagenômicos da pele humana, investigando possíveis correlações com o estado de saúde e características dos voluntários.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Identificar estudos que caracterizam as comunidades fúngicas residentes da pele humana através de NGS por meio de uma revisão sistemática da literatura;

2.2.2. Localizar, na base de dados *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI, os dados de sequenciamento produzidos por estes estudos, quando publicamente disponibilizados, assim como metadados associados;

2.2.3. Avaliar a prevalência e abundância de sequências não caracterizadas representantes de possíveis novas espécies de *Malassezia*, nos conjuntos de dados metagenômicos;

2.2.4. Estabelecer possíveis relações entre abundância e prevalência dos organismos com as características dos voluntários como condição de saúde, sexo e idade, através de testes estatísticos.

3. Metodologia

3.1. Revisão sistemática da literatura

Inicialmente, será desenvolvida uma revisão sistemática da literatura, a fim de identificar estudos que caracterizem - através de sequenciamento por NGS de amplicon e/ou metagenômica - a microbiota fúngica da pele humana. O protocolo seguido para este fim será o PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*), a fim de garantir o maior grau de transparência e padronização dos critérios de inclusão e exclusão. O PRISMA propõe um fluxo de trabalho a ser seguido, com etapas bem delineadas, utilização de critérios objetivos e execução de triagem sistematizada da literatura, a fim de tornar a metodologia reprodutível e minimizar ao máximo a existência de vieses nessa seleção (Page *et al.*, 2021).

Serão realizadas buscas nas bases Pubmed e Web of Science. Os artigos selecionados deverão ser artigos originais correspondentes a estudos envolvendo a caracterização da comunidade fúngica de amostras de pele humana, utilizarem de alguma tecnologia de NGS e estarem publicados em inglês. Após a realização de alguns testes utilizando combinações de palavras-chave variadas, buscando restringir a busca a uma quantidade viável para a triagem, definiu-se os termos, em inglês, “fungal community”, “fungi”, “mycobiome”, “skin”, “human” e “sequencing” para as buscas. Os termos referentes aos fungos e à pele humana serão buscados nos resumos - sessão *Abstract* - dos artigos, a fim de eliminar os resultados que contêm estes termos em alguma parte do texto mas não tratam, especificamente, destes objetos de estudo.

Na sintaxe da base de dados Pubmed, a busca realizada será: (skin[Title/Abstract] AND human[Title/Abstract]) AND (fungi[Title/Abstract] OR "fungal community"[Title/Abstract] OR mycobiome[Title/Abstract]) AND sequencing. Na sintaxe da base Web of Science será: AB=(skin AND human) AND AB=("fungal community" OR mycobiome OR fungi) AND ALL=sequencing.

3.2. Obtenção de dados metagenômicos a partir do banco SRA

Os dados originais de sequenciamento produzidos pelos estudos selecionados serão localizados no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), e recuperados em formato FASTQ através da utilização do SRA Toolkit, ferramenta de bioinformática disponibilizada gratuitamente pelo NCBI para o *download* de grandes volumes de dados desta base. Espera-se que os diferentes estudos tenham utilizado o sequenciamento completo do genoma dos organismos ou marcadores moleculares da região do DNA ribossomal, em particular regiões intergênicas do operon do RNA ribossomal - chamados ITS1 e ITS2 - para fins de caracterização das comunidades fúngicas das amostras (Schoch et al., 2012). Desta maneira, para verificar esta suposição, será realizada uma caracterização geral dos conjuntos de dados obtidos a partir dos artigos, identificando o tipo de dado produzido por cada estudo, como este está organizado na base de dados e onde podem ser encontrados metadados associados, quando disponíveis.

3.3. Busca por sequências de interesse nos conjuntos de dados

Os conjuntos de dados serão analisados quanto à presença de grupos de organismos previamente apontados como possíveis espécies ainda não descritas do gênero *Malassezia*. Dados de estudos anteriores indicam que estes organismos não identificados podem ser prevalentes na microbiota cutânea, além de consideravelmente abundantes em algumas amostras independentemente do estado de saúde da pele (Soares et al., 2015; Soares et al., 2016). Vale mencionar, também, que estudos anteriores também relataram indícios da presença de possíveis organismos não conhecidos do gênero *Malassezia* em amostras de pele humana (Paulino et al., 2006; Paulino et al., 2008; Castellá et al., 2014).

Os organismos pertencentes a possíveis novas espécies tiveram um segmento mais abrangente do operon do RNA ribossomal sequenciado (dados não publicados), ampliando as possibilidades de comparação com os bancos de dados. Análises filogenéticas corroboraram a hipótese de que pelo menos um dos grupos de fungos não caracterizados de fato representa uma nova espécie (dados não publicados). O outro segue indeterminado. As sequências referentes a estes dois grupos foram depositadas no banco de dados *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sob os códigos de acesso MT895507 e MT895508.

As sequências da região ITS1/5.8S/ITS2 do DNA ribossomal destes dois organismos serão utilizadas no presente projeto, avaliando-se sua presença, prevalência e abundância relativa nos conjuntos dados gerados pelos estudos selecionados na etapa de revisão sistemática, utilizando os trechos adequados desta sequência para comparação em cada situação a depender das características particulares de cada estudo. A detecção das sequências de interesse nos conjuntos de dados se dará através de alinhamentos e avaliação do percentual de identidade. Serão realizados testes estatísticos, incluindo análises multivariadas utilizando

os metadados disponíveis sobre cada conjunto de dados, a fim de investigar possíveis padrões existentes em relação à presença e abundância relativa destes organismos na microbiota cutânea e fatores como idade, região do corpo, localização geográfica, sexo e estado de saúde dos voluntários.

4. Resultados preliminares

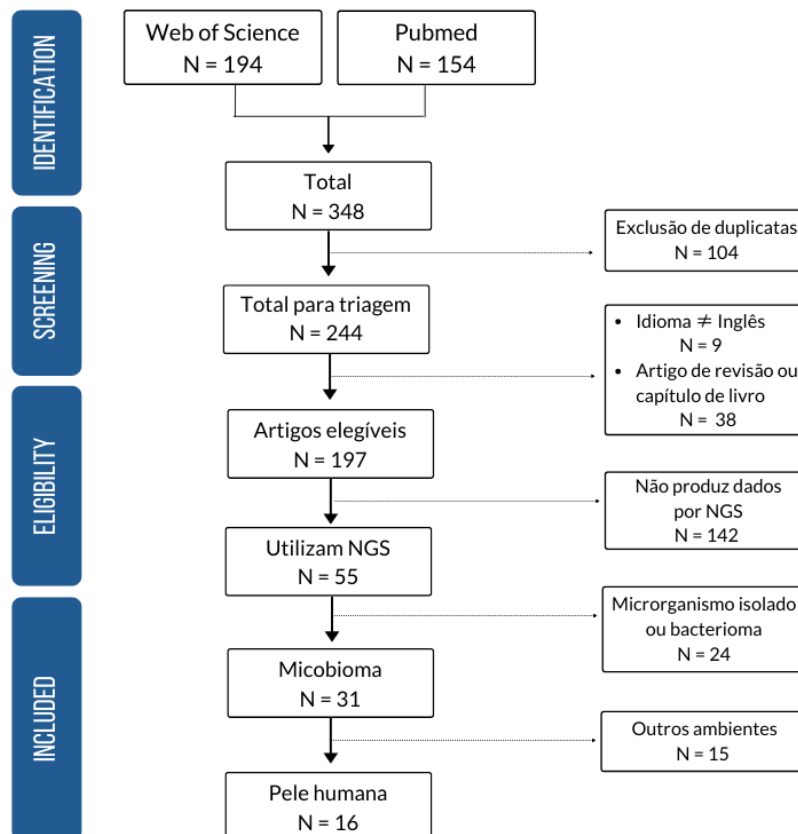


Figura 1: Fluxograma, no padrão PRISMA, referente à busca, triagem e seleção preliminar de artigos para a revisão sistemática.

Os resultados iniciais da revisão sistemática estão representados na **Figura 1**. Foram realizadas buscas preliminares, utilizando as palavras-chave e critérios de busca estabelecidos, nas bases Pubmed e Web of Science, constituindo a etapa inicial do fluxograma de trabalho PRISMA, a etapa de Identificação (*Identification*). Realizou-se uma seleção preliminar de artigos para o desenvolvimento da meta-análise dos dados. A fim de tornar a seleção objetiva e sistemática, os critérios de inclusão e exclusão foram determinados em uma organização hierárquica. No processo de Triagem (*Screening*), excluiu-se, primeiramente, os resultados que não correspondem a artigos originais. Em seguida, foram eliminados os artigos originais publicados em outro idioma que não inglês. No método PRISMA, esta primeira etapa envolve uma seleção mais generalista dos resultados.

As etapas posteriores envolveram uma busca mais ativa dentre os artigos elegíveis. Para tal, foram acessados os textos completos dos artigos, onde buscou-se, primeiramente, a utilização de métodos de NGS para a realização de sequenciamento genômico ou por amplicon na metodologia empregada. Esta etapa é chamada Elegibilidade (*Eligibility*) no modelo PRISMA. Dentre os artigos que se encaixam neste critério, buscou-se informações sobre a abrangência destes sequenciamentos para a última etapa do processo, a etapa de Inclusão (*Included*). Foram excluídos da seleção estudos que não envolvem o sequenciamento de comunidades microbianas como um todo, tratando apenas de organismos isolados ou especificamente da comunidade bacteriana. Foram selecionados então, a partir deste grupo de artigos, os estudos envolvendo a microbiota da pele humana.

A busca abrangeu um total de 244 resultados, excluindo as duplicatas encontradas em ambas bases de dados. Ao final, foram selecionados 16 artigos. A seleção incluiu artigos sobre caracterização da microbiota cutânea de pessoas saudáveis - o que inclui estudos com voluntários profissionais de determinadas áreas de trabalho, estudos comparativos entre crianças e adultos, análises comparativas de diferentes regiões da pele, estudo com voluntários de uma localização geográfica e/ou sexo específicos, entre outros - assim como de pessoas com patologias, como dermatite seborreica e imunodeficiências. Verificou-se, também, a disponibilidade de acesso aos dados produzidos por estes estudos. Os conjuntos de dados produzidos por 15 dos 16 artigos selecionados estão disponíveis na base SRA.

5. Viabilidade

Os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho são integralmente computacionais, sendo que os dispositivos eletrônicos essenciais encontram-se disponíveis para utilização nas dependências da Universidade - em particular, do laboratório ao qual este projeto encontra-se vinculado. Além disso, os dados aqui analisados são de domínio público e encontram-se facilmente acessíveis nas diferentes bases de dados do NCBI (como o Pubmed e o SRA) e na Web of Science. As técnicas de análise de dados empregadas são técnicas básicas de Bioinformática, compreendidas e selecionadas para o desenvolvimento deste estudo a partir de reuniões de orientação periódicas individuais e/ou junto ao grupo de pesquisa, sob coordenação de docente responsável. As informações obtidas a partir deste estudo estão bem inseridas no escopo maior do trabalho desenvolvido pelo grupo de pesquisa e seus diferentes integrantes. Além disso, neste quadrimestre letivo, o desenvolvimento do projeto está contextualizado de maneira paralela e dialogada em relação aos estudos desenvolvidos na disciplina de Evolução Molecular.

6. Cronograma de atividades

Etapas 1: Revisão sistemática da literatura.

Etapas 1.a: Pesquisa em bancos de dados, triagem dos resultados e seleção de artigos;

Etapas 1.b: Análise da disponibilidade dos dados brutos e metadados associados produzidos pelos artigos selecionados na base SRA do NCBI.

Etapa 2: Obtenção de dados para meta-análise.

Etapa 2.a: Familiarização com as ferramentas bioinformáticas necessárias para obtenção dos dados a partir do SRA;

Etapa 2.b: Recuperação dos dados disponíveis para cada estudo;

Etapa 2.c: Caracterização dos dados e metadados em termos da organização das informações nos arquivos recuperados;

Etapa 2.d: Alinhamento de parte dos dados obtidos com as sequências de interesse para fins de teste e avaliação da necessidade de ajustes metodológicos.

Etapa 3: Elaboração do relatório parcial.

Etapa 3.a: Elaboração do relatório parcial de IC referente ao primeiro semestre do projeto.

Etapa 4: Análise dos dados metagenômicos.

Etapa 4.a: Alinhamento das sequências de interesse com os dados obtidos dos artigos selecionados e avaliação dos percentuais de identidade;

Etapa 4.b: Determinação da abundância relativa das sequências de interesse em cada conjunto de dados, quando aplicável;

Etapa 4.c: Determinação da prevalência das sequências de interesse em relação aos dados dos artigos selecionados como um todo.

Etapa 5: Realização de testes estatísticos.

Etapa 5.a: Análise dos dados disponíveis e determinação das variáveis que serão consideradas para análise estatística;

Etapa 5.b: Elaboração de análise multivariada incluindo dados e metadados.

Etapa 6: Elaboração do relatório final.

Etapa 6.a: Elaboração do relatório final do projeto.

Etapa 7: Acompanhamento da literatura.

Etapa 7.a: Acompanhamento contínuo da literatura de interesse para o projeto a fim de elaborar uma boa discussão dos resultados à luz da literatura mais atualizada possível.

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1.a	X	X										
1.b		X										
2.a			X	X								
2.b				X								
2.c					X							
2.d					X	X						
3.a						X	X					
4.a							X	X	X			
4.b									X			
4.c									X			
5.a										X		
5.b										X	X	
6.a											X	X
7.a	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Após a conclusão deste cronograma de atividades, o projeto será apresentado no Simpósio de Iniciação Científica da UFABC (SIC-UFABC), que acontecerá no segundo semestre de 2023, em data a definir.

7. Referências

- ABDILLAH, A.; RANQUE, S. Chronic Diseases Associated with Malassezia Yeast. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 10, 12 out. 2021.
- AMEND, A. From Dandruff to Deep-Sea Vents: Malassezia-like Fungi Are Ecologically Hyper-diverse. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004277, 21 ago. 2014.
- ASHBEE, H. R. Update on the genus Malassezia. **Medical mycology**, v. 45, n. 4, p. 287–303, jun. 2007.
- ASSAF, R. R.; WEIL, M. L. The superficial mycoses. **Dermatologic clinics**, v. 14, n. 1, p. 57–67, jan. 1996.
- BAY, L.; RING, H. C. Human skin microbiota in health and disease: The cutaneous communities' interplay in equilibrium and dysbiosis: The cutaneous communities' interplay in equilibrium and dysbiosis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, 17 dez. 2021.
- BERGBRANT, I. M.; FAERGEMANN, J. Adherence of Malassezia furfur to human stratum corneum cells in vitro: a study of healthy individuals and patients with seborrhoeic dermatitis. **Mycoses**, v. 37, n. 5–6, p. 217–219, jul. 1994.
- BHAT, A.; PRABHU, P. OTU Clustering: A window to analyse uncultured microbial world. **International Journal of Scientific Research in Computer Science and Engineering**, v. 5, p. 62–68, 1 dez. 2017.
- BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143–155, mar. 2018.
- CATINEAN, A. et al. Microbiota and Immune-Mediated Skin Diseases-An Overview. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 279, 21 ago. 2019.
- CLEMENTE, J. C. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p.

1258–1270, 16 mar. 2012.

DESSINIOTI, C.; KATSAMBAS, A. Seborrheic dermatitis: etiology, risk factors, and treatments: facts and controversies. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 4, p. 343–351, ago. 2013.

ELIAS, P. M. Primary role of barrier dysfunction in the pathogenesis of atopic dermatitis. **Experimental dermatology**, v. 27, n. 8, p. 847–851, ago. 2018.

FINDLEY, K. et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. **Nature**, v. 498, n. 7454, p. 367–370, 20 jun. 2013.

GAITANIS, G. et al. Skin diseases associated with Malassezia yeasts: facts and controversies. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 4, p. 455–463, ago. 2013.

GEBRAYEL, P. et al. Microbiota medicine: towards clinical revolution. **Journal of translational medicine**, v. 20, n. 1, p. 111, 7 mar. 2022.

GUILLOT, J.; BOND, R. Malassezia Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 79–79, 28 fev. 2020.

HADI, H. A. et al. The Epidemiology and Global Burden of Atopic Dermatitis: A Narrative Review. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 9, 9 set. 2021.

HONG, J.; KOO, B.; KOO, J. The psychosocial and occupational impact of chronic skin disease. **Dermatologic therapy**, v. 21, n. 1, p. 54–59, fev. 2008.

JO, J.-H.; KENNEDY, E. A.; KONG, H. H. Topographical and physiological differences of the skin mycobiome in health and disease. **Virulence**, v. 8, n. 3, p. 324–333, 3 abr. 2017.

KARIMKHANI, C. et al. Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. **JAMA dermatology**, v. 153, n. 5, p. 406–412, 1 maio 2017.

KHOMICH, M. et al. Coming up short: Identifying substrate and geographic biases in fungal sequence databases. **Fungal Ecology**, v. 36, p. 75–80, 1 dez. 2018.

MARCON, M. J.; POWELL, D. A. Human infections due to Malassezia spp. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 2, p. 101–119, abr. 1992.

MAZMANIAN, S. K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 107–118, 15 jul. 2005.

MIHU, C. et al. Novel concepts in psoriasis: histopathology and markers related to modern treatment approaches. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 62, n. 4, p. 897–906, dez. 2021.

MISHRA, K.; BUKAVINA, L.; GHANNOUM, M. Symbiosis and Dysbiosis of the Human Mycobiome. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 636131, 2021.

OH, J. et al. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 854–866, 5 maio 2016.

PAGE, M. J. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 372, p. n71, 29 mar. 2021.

PARK, H. K. et al. Characterization of the fungal microbiota (mycobiome) in healthy and dandruff-afflicted human scalps. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e32847, 2012.

PARK, T. et al. Collapse of human scalp microbiome network in dandruff and seborrheic dermatitis. **Experimental Dermatology**, v. 26, n. 9, p. 835–838, 1 set. 2017.

PÄRNA, E.; ALUOJA, A.; KINGO, K. Quality of life and emotional state in chronic skin disease. **Acta dermato-venereologica**, v. 95, n. 3, p. 312–316, mar. 2015.

PAULINO, L. C. et al. Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic

lesions. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2933–2941, ago. 2006.

PAULINO, L. C. New perspectives on dandruff and seborrheic dermatitis: lessons we learned from bacterial and fungal skin microbiota. **European journal of dermatology : EJD**, v. 27, n. S1, p. 4–7, 1 jun. 2017.

PAULINO, L. C.; TSENG, C.-H.; BLASER, M. J. RESEARCH ARTICLE: Analysis of Malassezia microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions by multiplex real-time PCR. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 3, p. 460–471, 1 maio 2008.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 340–349, maio 2010.

PEREIRA, M. S.; REDANZ, S.; KRIEGLER, M. A. Skin Deep: The Role of the Microbiota in Cutaneous Autoimmunity. **Special Issue on Autoimmunity**, v. 142, n. 3, Part B, p. 834–840, 1 mar. 2022.

RATH, S. et al. Pathogenic functions of host microbiota. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 174, 28 set. 2018.

REUTER, J. A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, M. P. High-throughput sequencing technologies. **Molecular cell**, v. 58, n. 4, p. 586–597, 21 maio 2015.

ROLSTON, K. Overview of systemic fungal infections. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 15, n. 11 Suppl 9, p. 11–14, nov. 2001.

SALMON, J. K.; ARMSTRONG, C. A.; ANSEL, J. C. The skin as an immune organ. **The Western journal of medicine**, v. 160, n. 2, p. 146–152, fev. 1994.

SCHMIDT, A. Malassezia furfur: a fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders. **Cutis**, v. 59, n. 1, p. 21–24, jan. 1997.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 17 abr. 2012.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, out. 2008.

SOARES, R. C. et al. Malassezia intra-specific diversity and potentially new species in the skin microbiota from Brazilian healthy subjects and seborrheic dermatitis patients. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117921, 2015.

SOARES, R. C. et al. Dysbiotic Bacterial and Fungal Communities Not Restricted to Clinically Affected Skin Sites in Dandruff. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 157, 2016.

SPARBER, F.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. Host Responses to Malassezia spp. in the Mammalian Skin. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1614, 2017.

TURNBAUGH, P. J. et al. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804–810, 18 out. 2007.

VIJAYA CHANDRA, S. H. et al. Cutaneous Malassezia: Commensal, Pathogen, or Protector? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 614446–614446, 26 jan. 2021.

WALKER, W. A. Chapter 25 - Dysbiosis. Em: FLOCH, M. H.; RINGEL, Y.; ALLAN WALKER, W. (Eds.). . **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology**. Boston: Academic Press, 2017. p. 227–232.

WIDHIATI, S. et al. The role of gut microbiome in inflammatory skin disorders: A systematic review. **Dermatology reports**, v. 14, n. 1, p. 9188, 11 mar. 2022.

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–e1005614, 5 nov. 2015.

ZHANG, E. et al. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. **Microbiology and immunology**, v. 55, n. 9, p. 625–632, set. 2011.