



CENTRO UNIVERSITÁRIO – CATÓLICA DE SANTA CATARINA

PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E
TECNOLÓGICA

- PIBIC/PIBITI**
vigência ago-2018/jul-2019
- PIBIC JR/PIBIC EM**
vigência ago-2018/jul-2019
- UNIEDU**
vigência mai-2019/abr-2020

RAFAEL DUTRA DE ARMAS
BIOMEDICINA

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DE CÃES SAUDÁVEIS E DIARREICOS

PROJETO DE PESQUISA DO PROFESSOR ORIENTADOR

PIBIC/PIBITI/UNIEDU

ÁREA ESTRATÉGICA DO PROJETO: Biologia Molecular

JOINVILLE
2018

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVO	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. MÉTODO	6
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1.1 Sequenciamento de nova geração	7
3.1.2 Análise de bioinformática - BLAST	8
3.1.3 Índice de diversidade (Shannon)	8
3.1.4 Análise estatística	9
4. CRONOGRAMA	10
5. RESUMO DO ORÇAMENTO:	11
REFERÊNCIAS	12

Projeto de pesquisa (Plataforma Lattes)

--

1. INTRODUÇÃO

O corpo de todos os organismos é colonizado por grande quantidade e variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Esses organismos residentes convivem em simbiose com seu hospedeiro. Estudos demonstraram que o trato gastrointestinal de mamíferos é colonizado por uma microbiota complexa que inclui bactérias, arqueias, fungos, protozoários e vírus. Estima-se que o trato gastrointestinal de cães apresente aproximadamente um trilhão de células componentes da microbiota, número esse 10 vezes maior do que as células do organismo hospedeiro (MARIA, 2017; HENRIQUE et.al., 2017; MALOZI, 2010).

Diferenças na microbiota podem ocorrer de acordo com a genética, idade, localização geográfica e especialmente com a dieta desses animais, sendo a microbiota definida como o conjunto de microrganismos presentes em ambiente definido ou, mais especificamente, a identificação taxonômica que está associada a um determinado ambiente, por exemplo, pelo sequenciamento do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal (rRNA) (MARIA, 2017).

A alteração de composição e/ou de variedade de espécies bacterianas da microbiota intestinal pode ser definida como disbiose, e pode estar associada com desordens do trato gastrointestinal e até mesmo de outros órgãos. As potenciais funções e interações entre organismo e microbiota em cães são amplas, porém ainda pouco exploradas. Existem como exemplos estudos que avaliaram desde a microbiota da pele de cães saudáveis e cães alérgicos até as populações de determinadas bactérias intestinais de cães com meningoencefalomielite (FOSTER et. al., 2015).

Atualmente, a microbiota gastrointestinal é reconhecida como um dos fatores que influenciam a homeostase, saúde e doenças diversas. Entretanto, a relação da nutrição de cães com estes microrganismos ainda precisa ser melhor elucidada. Dado o papel do trato gastrointestinal na digestão e sistema imune principalmente, perfis microbianos e de seus metabólitos podem influenciar na saúde dos animais como um todo, assim como na saúde dos tutores e de outras pessoas com as quais têm contato (ARAÚJO et. al., 2016).

Dentre as principais enfermidades que acometem cães podemos destacar a diarreia. No Brasil ela usualmente é causada por infecções virais (parvovírus e cinomose), entretanto, outras causas potenciais incluem bactérias, fungos, protozoários, alterações alimentares, parasitas helmintos e doença imunomediada. Em cães e em outras espécies, a microbiota intestinal beneficia o hospedeiro, agindo como barreira de defesa contra enteropatógenos, ajudando na digestão de fibras complexas, além de ser fundamental para o desenvolvimento e regulação do sistema imune do hospedeiro. No entanto, frente aos quadros de diarreia, acontece um desequilíbrio da microbiota normal e que tem consequências negativas para o paciente (KOSIEWICZ, 2011). Diante dessa problemática surge a pergunta que norteia essa pesquisa. Existe diferença entre a microbiota intestinal de cães saudáveis e diarreicos?

Caso a resposta seja positiva, poderemos caracterizar quais microrganismos são essenciais na composição da microbiota de cães para que ocorra o controle dos processos diarreicos nesses animais.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar a microbiota de cães saudáveis e diarreicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar as espécies bacterianas presentes no intestino de cães;
- Diferenciar a microbiota de animais sadios e diarreicos;
- Propor alternativas de tratamento para o equilíbrio da microbiota.

3. MÉTODO

Para realização do trabalho será utilizada a metodologia experimental transversal. São estudos em que a exposição ao fator ou causa está presente ao efeito no mesmo momento ou intervalo de tempo analisado. Aplicam-se às investigações dos efeitos por causas que são permanentes, ou por fatores dependentes de características permanentes dos indivíduos, como efeito do sexo ou cor da pele sobre determinada doença. (HOCHMAN, et. al., 2005).

No trabalho serão utilizados no total 40 animais. Entre eles 20 serão cães saudáveis e os outros 20 serão cães diarreicos.

Serão utilizados no estudo cães escolhidos por veterinários da cidade de Joinville, estes serão escolhidos se atenderem ao critério de inclusão de que os animais tenham até sete anos. Critérios de exclusão utilizados é de animais acima de sete anos e que apresentem doenças que possam alterar a microbiota de alguma forma.

Após a coleta de fezes dos animais que será feita pelos veterinários as amostras serão encaminhadas para Florianópolis para que possa ser feita a caracterização das microbiotas através da técnica de PCR de biologia molecular.

A empresa que irá realizar as técnicas de biologia molecular para a caracterização da microbiota será a Neopropecta, localizada em Florianópolis, Santa Catarina. Suas atividades compreendem a análise genômica, de microbiota, bioinformática, e biologia molecular.

Para a análise de microbiota a empresa utiliza de técnicas modernas e inovadoras, como a PCR, análise com biocomputadores, e sequenciamento de nova geração. Para a interpretação dos resultados utiliza de um software moderno chamado Neobiome.

Como missão da empresa a Neopropecta tem como o seguinte lema “Mudar o paradigma da microbiologia com soluções inovadoras de alto impacto e democratizar o acesso a análises microbiológicas de ponta.” afim de se tornar uma referência de nível mundial na análise de microbiotas. Pode ser contatada através do site: <https://neopropecta.com/>.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de nova geração é uma forma eficaz para o estudo do genoma, através desta técnica de biologia molecular é possível analisar a forma estrutural e funcional do genoma. Essa forma de sequenciamento possui muitas vantagens em relação ao custo e ao tempo, por ser uma forma mais barata e rápida para obter determinadas informações sobre o genoma.

Essa maior eficiência advém do uso da clonagem e *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intenso trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem de placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis. (CARVALHO, 2010).

Para realização do sequenciamento do genoma será utilizada a região 16S rRNA da região V3-V4. É a melhor região para ser amplificada por fornecer mais informações sobre os microrganismos e conseguir identificar uma maior quantidade dos mesmo (CHRISTOFF, 2017).

O primeiro primer a ser utilizado será a sequência Illumina baseada em TruSeq structurapapter, esse primer permitirá a segunda PCR que utiliza sequências de indexação, que será triplicada utilizando Platinum Taq. Seguindo as seguintes condições para realização dos processos: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45s, 55 °C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 2 min para PCR 1. Em PCR2 as condições serão 95 °C durante 5 min, 10 ciclos de 95 °C durante 45 s, 66 °C durante 30 s e 72 °C durante 45 s e uma extensão final de 72 °C durante 2 min. Ao finalizar estes processos a reação da PCR será limpa com esferas AMPureXP e as amostras utilizadas serão colocadas em uma biblioteca de sequenciamento para quantificação. Após esse processo ocorrerá a realização de ensaio com Picogreen dsDNA para estimar a amplificação da amostra, em seguida, as bibliotecas serão

diluídas utilizando as plataformas KAPALibrary Quantification Kitfor Illumina para quantificação de qPCR. (CHRISTOFF, 2017).

3.1.2 Análise de bioinformática - BLAST

A análise de bioinformática (BLAST) é uma das maneiras mais eficaz e rápida para analisar o sequenciamento de microrganismos, possibilita fazer a diferenciação de diversos dados que se correlacionam com cada microrganismo e suas consequências para o organismo. Uma das grandes vantagens do BLAST é que possibilita um grande armazenamento de dados.

A bioinformática trouxe várias evoluções para a biologia por conseguir juntar a matemática, a análise de dados, programas de computador e dados ligados a biologia em um único lugar, sendo de grande ajuda na biologia molecular e suas análises (PEREIRA, 2014).

Na microbiologia a bioinformática tem um grande destaque por conseguir armazenar uma grande quantidade de informações sobre sequências genômicas em um único lugar (PEREIRA, 2014).

3.1.3 Índice de diversidade (Shannon)

Os índices de diversidade são um modelo para determinar a riqueza e os dados de diversas espécies, ou seja, determina o quão presentes estão em um local e para definir características específicas delas.

Para determinação desses dados são levados em conta a uniformidade quanto a riqueza da espécie, esses dados são chamados de dados de heterogeneidade, e o aumento do número de espécies ou o aumento no número de diversidade de espécies encontradas.

O índice de Shannon-Wiener, é um dos mais usados para análises ecológicas na atualidade, além de dar dados a espécies mais conhecidas ajuda na determinação de dados sobre espécies mais raras de se encontrar.

3.1.4 Análise estatística

Uma das formas de avaliação dos dados é pela análise discriminante. O método de análise discriminante está associado a uma combinação de variáveis independentes com a finalidade de separar os objetos de estudo em grupos. Nesse caso as variantes analisadas são as bactérias presentes na microbiota dos animais verificados a fim definir um padrão para o grupo diarréico. Para ordenação dos objetos o método de escalonamento multidimensional não-métricos (NMDS) é o escolhido por ser muito flexível não assumindo qualquer tipo específico de relação entre a distância calculada e a medida de similaridade. Além disso, o ANOSIM (Análise de Similaridade) serve para determinar as diferenças significativas nas comunidades microbianas entre animais saudáveis e animais diarreicos. Os dados serão inseridos no programa (em verificação) com um valor de confiabilidade de 0,05 (HAIR JR, 2009).

4. CRONOGRAMA

Atividades	2018					2019						
	A G O.	S E T.	O U T.	N O V.	D E Z.	J A N.	F E V.	M A R.	A B R.	M A I O	J U N.	J U L.
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X						
Coleta das amostras		X	X	X								
Sequenciamento do DNA			X	X	X							
Análises de bioinformática				X	X	X	X					
Análise dos resultados					X	X	X	X				
Relatório final							X	X	X			
Participação em Congresso									X	X		
Elaboração de artigo científico										X	X	X

5. RESUMO DO ORÇAMENTO:

	FERJ Setor de Pesquisa		
Elementos de Despesa	Quantidade	Descrição	Preço Unitário R\$
Participação em eventos			
Passagens e Despesa de Locomoção.			
Material de Consumo (descrever todos os itens ex: Papel A4, disquetes, etc..)			
Aquisição de Livros			
Cópias monocromáticas, fotocópia colorida, fotos aéreas, mapas, plotagens, cópias em metro.			
Equipamentos e Material Permanente			
Outros	5	Serviço de terceiros (Sequenciamento de DNA)	200,00
TOTAL DO PROJETO			1.000,00

REFERÊNCIAS

CHRISTOFF, Ana Paula, et. al. **Identificação bacteriana através de uma preparação precisa da biblioteca e sequenciamento de alto rendimento.** Neoprospecta Microbiome Technologies, SA. Florianópolis, 2017.

FOSTER, Maey J. et al. **O microbioma fecal em gatos com diarreia.** PloS one, v. 10, n. 5, p. e0127378, 2015.

HAIR JR ,Joseph F.; et al. **Análise multivariada de dados.** 6. ed. Porto Alegre : Bookman, 2009.

MARIA, Ana Paula Judice. **Efeito de idade e dietas com diferentes fontes de proteína e carboidrato sobre a microbiota associada à mucosa gastrointestinal de cães.** 2017.

MALOZI, Márcia Carvalho. **A importância da microbiota no sistema imunológico.** *Pediatria Moderna*, v. 48, p. 387-392, 2010.

PEREIRA, Vivian M. Y. **Montagem e análise de genomas a partir de metagenomas.** Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://each.usp.net.usp.br/digiampietri/bibtex/2014_MonografiaVivianPereira.pdf>. Acessado em 13 de julho de 2018.

MACEDO, Henrique T. et al. **CAPÍTULO X MICROBIOMA DE CÃES. Novos Desafios da Pesquisa em Nutrição e Produção Animal**, p. 190.

KOSIEWICZ MM, Zirnheld A L, Alard P. **Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship.** Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00180/full>>. *Front Microbial* 2011, 2:1-11.

PAIXÃO, Ludmilla Araújo; DOS SANTOS CASTRO, Fabiola Fernandes. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 85-96, 2016.