



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**

LUÍS EDUARDO MAESTRELLI BIZZO  
BIOMEDICINA

Caracterização da Microbiota de Gatos para o Tratamento de Diarreias

**PROJETO DE PESQUISA DO PROFESSOR ORIENTADOR**

**PIBIC/PIBITI/UNIEDU**

**ÁREA ESTRATÉGICA DO PROJETO: (se for o caso)**

**JOINVILLE  
2018**

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO**

**3**

**2 OBJETIVO**

**4**

2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
<b>3 MÉTODO</b>	<b>4</b>
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	5
3.1.1 Sequenciamento de nova geração	5
3.1.2 Análise de bioinformática - BLAST	6
3.1.3 Índice de diversidade (Shannon)	7
3.1.4 Análise estatística	7
<b>4 CRONOGRAMA</b>	<b>8</b>
<b>5 RESUMO DO ORÇAMENTO</b>	<b>8</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>9</b>

Projeto de pesquisa (Plataforma Lattes)

--

## **1 INTRODUÇÃO**

Microbioma ou microbiota se caracteriza pelo conjunto de microrganismos que residem num organismo ou região havendo relação de ambos. Em um hospedeiro eles participam nos genomas, transcriptomas, proteomas e metabolomas. Podem sofrer interferência por fatores internos, como pH, umidade e temperatura, e fatores externos como a dieta. Seu desenvolvimento está relacionado ao ambiente em que está associado (MIMICA, 2017).

Um conjunto de microrganismos é responsável por várias alterações no meio em que se aplica. Por esse motivo a microbiota tem um forte impacto na saúde dos gatos, onde uma pequena alteração na flora intestinal pode ocasionar patologias gastrointestinais. Dessa forma, é necessário identificar e caracterizar os microrganismos contidos na microbiota, tanto de gatos saudáveis quanto enfermos, afim de apontar microrganismos isolados ou em conjunto causando diarreia (RAMADAN, 2014).

O reconhecimento de organismos responsáveis pelo desbalanço do metabolismo possibilita a realização de tratamentos específicos, diminuindo ou até mesmo eliminando as bactérias causadoras de patologia. Além disso, viabiliza o uso de novos tratamentos desses animais, buscando solucionar certos distúrbios gastrointestinais (RAMADAN, 2014).

O estudo do microbioma tem crescido desde 2008 quando teve início o mapeamento do microbioma humano buscando referências de sequências do genoma microbiano. Apesar de o conhecimento das sequências ser muito vasto, ainda é um pouco obscuro o conhecimento da relação de microrganismos com a ocorrência de diarreias. Por esse motivo é importante identificar e caracterizar o microbioma em quadros saudáveis ou não associando sua frequência (RIBEIRO,2014).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Caracterizar a microbiota de gatos saudáveis e diarreicos.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar as espécies presentes no intestino de gatos;
- 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 de 40 gatos, destes 20 serão gatos saudáveis e 20 serão gatos diarreicos.

Serão utilizados no estudo gatos escolhidos por veterinários da cidade de Joinville. Estes animais serão escolhidos se atenderem ao critério de inclusão de que os animais tenham até sete anos. Os critérios de exclusão são: animais acima de sete anos ou 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.

O presente projeto é fruto da parceria de professores do curso de Biomedicina com a empresa que irá realizar as técnicas de biologia molecular para a caracterização da microbiota, a Neopropecta, localizada em Florianópolis, Santa Catarina, e prescinde de aprovação por comitê de ética.

### 3.1 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 intensivo 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).

### **3.2 Análise de bioinformática - BLAST**

A análise de bioinformática (BLAST) é uma das maneiras mais eficazes e rápidas para analisar o sequenciamento de microrganismos, pois possibilita a comparação e diferenciação de sequências de DNA (PEREIRA, 2014). Esta ferramenta será utilizada para o alinhamento dos *reads* gerados pelo sequenciamento e identificação das espécies de microrganismos presentes na microbiota intestinal.

### **3.3 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.

### **3.4 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. Todas as análises serão realizadas no programa STATISTICA 10.0, utilizando 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 de dados				X	X	X						
Relatório Parcial						X	X					
Análise dos resultados						X	X	X	X			
Relatório Final										X	X	X

#### 5 RESUMO DO ORÇAMENTO

*(O valor não poderá exceder **R\$ 1.000,00** para a execução do projeto)*

Elementos de Despesa	FERJ Setor de Pesquisa		
	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	<b>1000,00</b>		
<b>TOTAL DO PROJETO</b>			

**Outros:** Serviços de terceiros: sequenciamento de DNA

#### REFERÊNCIAS

CHRISTOFF, Ana Paula, et. al. **Identificação bacteriana através de uma preparação precisa da biblioteca e sequenciamento de alto rendimento.** Neopropecta 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.

MIMICA, Marcelo Jenné. **Microbioma humano:** conceito, principais características, e potenciais implicações patológicas e terapêuticas. Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2017;62(1):42-5.

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](http://each.usp.net.usp.br/digiampietri/bibtex/2014_MonografiaVivianPereira.pdf)>. Acessado em 13 de julho de 2018.

RAMADAN, Z.; et al. **Fecal Microbiota of Cats with Naturally Occurring Chronic Diarrhea Assessed Using 16S rRNA Gene 454-Pyrosequencing before and after Dietary Treatment.** Journal Veterinary Internal Medicine: 2014; 28:59–65.



RIBEIRO, Aline Aparecida; LANGBEHN, Johannes Kunert; DIAMANTE, Nathalia Alves; et al. **Microbioma Humano**: uma interação predominantemente positiva? Uningá Review: 2014. Revista Uningá Review. Vol.19,n.1,pp.38-43 (Jul - Set 2014).