ROBERTO MARQUES RIBEIRO

**Estudo do efeito de diferentes métodos de armazenamento das amostras
de fezes para a caracterização da microbiota intestinal, por meio de
sequenciamento de nova geração**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

São Paulo

2017

ROBERTO MARQUES RIBEIRO

**Estudo do efeito de diferentes métodos de armazenamento das amostras
de fezes para a caracterização da microbiota intestinal, por meio de
sequenciamento de nova geração**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Roberto Marques

Estudo do efeito de diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes para a caracterização da microbiota intestinal, por meio de sequenciamento de nova geração / Roberto Marques Ribeiro. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Ester Cerdeira Sabino.

Descritores: 1.Microbioma intestinal 2.Sequenciamento de nova geração
3.Guanidina 4.Microbiota 5.Armazenamento de substâncias, produtos e materiais
6.Fezes 7.RNA ribossômico 16S

USP/FM/DBD-207/17

Ao meu pai, José Roberto Pinho
Ribeiro, meu grande exemplo de dignidade
e caráter; e à minha mãe, Maria Cristina
Marques Ribeiro, por sempre me motivar e
me alegrar em todos os momentos da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me permitir existir e por guiar meus passos, todos os dias.

Aos meus pais, meus maiores exemplos.

À minha esposa Raphaela, por me incentivar em todos os momentos.

À minha orientadora, professora Ester Sabino por contribuir imensamente para o meu sucesso pessoal e profissional.

Às pessoas do LIM 46, especialmente à Lea e Marcela, que contribuíram imensamente para que esse trabalho fosse possível.

Aos voluntários desse projeto, pois sem eles, nada disso seria possível.

Ao CNPQ por subsidiar-me com bolsa de estudos.

E por fim, à toda minha família e amigos por sempre contribuírem com meu sucesso, em todos os momentos. Amo todos vocês!

Esta dissertação ou 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.

"Mais cedo ou mais tarde, quem cativa
a vitória é aquele que crê plenamente:

Eu conseguirei!"

Napoleon Hill

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A microbiota humana	2
1.2	A microbiota intestinal	3
1.3	O desenvolvimento da microbiota intestinal	3
1.4	Microbiota em adultos	5
1.5	Alterações na microbiota intestinal	6
1.6	Análise molecular da microbiota	7
1.7	Interferentes no sequenciamento	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Desenho do Estudo	16
3.2	Caracterização do local do estudo	16
3.3	População de estudo e seleção da casuística	16
3.3.1	Seleção dos casos	16
3.3.2	Critérios de exclusão	17
3.3.3	Aspectos éticos do estudo	17
3.4	Métodos	18

3.4.1	Método molecular para estudo da microbiota	18
3.4.1.1	Extração de DNA das amostras fecais.....	19
3.4.1.2	Quantificação do DNA	21
3.4.1.3	Amplificação das regiões-alvo.....	21
3.4.1.4	Purificação dos produtos de PCR.....	23
3.4.1.5	Preparo da mistura equimolar dos produtos amplificados.....	24
3.4.1.6	PCR em emulsão e enriquecimento.....	25
3.4.1.7	Reação de sequenciamento.....	26
3.4.1.8	Processamento de dados, anotação e análise estatística.....	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Análise da microbiota intestinal	30
4.1.1	Caracterização da microbiota intestinal em diferentes métodos de armazenamento por um período de 48 horas	30
4.1.1.1	Análise da Alfa Diversidade.....	39
4.1.1.2	Análise da Beta Diversidade	44
4.1.2	Caracterização da microbiota intestinal em diferentes métodos de armazenamento por um período de 60 dias.....	48
4.1.2.1	Análise da Alfa Diversidade.....	54
4.1.2.2	Análise da Beta Diversidade	56
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	67
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	ANEXOS	69
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regiões variáveis do RNA ribossomal 16S.....	9
Figura 2 – Gráfico de alfa rarefação, demonstrando o número de espécies observadas em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.....	40
Figura 3 – Gráfico de alfa rarefação do índice de Shannon, em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.....	41
Figura 4 – Gráfico de alfa rarefação do índice de Simpson, em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.....	42
Figura 5 – Gráfico de alfa rarefação do índice de Chao1, demonstrando a estimativa de riqueza total à partir do número de espécies observadas, em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.....	43
Figura 6 – Visualização da análise PCoA baseada na matriz de distância Unifrac não-ponderada.....	45
Figura 7 – Visualização da análise PCoA baseada na matriz de distância Unifrac ponderada.....	47
Figura 8 – Gráfico de alfa rarefação, demonstrando o número de espécies observadas em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas e armazenadas em guanidina à temperatura ambiente e 4°C durante	

60 dias.....55

Figura 9 – Visualização da análise PCoA baseada na matriz de distância Unifrac ponderada para amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias e amostras frescas.....57

Figura 10 – Visualização da análise PCoA baseada na matriz de distância Unifrac não-ponderada para amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias e amostras frescas.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estatísticas descritivas dos pacientes do estudo.	31
Tabela 2 – Abundância relativa dos principais filos encontrados nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.....	33
Tabela 3 – Abundância relativa das principais classes encontradas nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.....	35
Tabela 4 – Abundância relativa das principais famílias encontradas nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.....	36
Tabela 5 – Abundância relativa dos principais gêneros encontradas nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.....	38
Tabela 6 – Estimativa da Alfa-Diversidade para as amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente..	44
Tabela 7 – Abundância relativa dos principais filos encontrados nas amostras frescas e armazenadas em guanidina a temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.....	49
Tabela 8 – Abundância relativa das principais classes encontradas nas amostras frescas e armazenadas em guanidina a temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.	50
Tabela 9 – Abundância relativa das principais famílias encontradas nas amostras frescas e armazenadas em guanidina a temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.	51

Tabela 10 – Abundância relativa dos principais gêneros encontrados nas amostras frescas e armazenadas em guanidina a temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.	53
Tabela 11 – Estimativa da Alfa-Diversidade para as amostras frescas, e armazenadas em guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente durante 60 dias.	56

LISTA DE ABREVIATURAS:

DNA – ácido desorribonucleíco

RNA - ácido ribonucleíco

PCR – reação em cadeia da polimerase

OTU – unidade taxonômica operacional

RESUMO

Ribeiro RM. *Estudo do efeito de diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes para a caracterização da microbiota intestinal, por meio de sequenciamento de nova geração* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A microbiota intestinal tem sido alvo de diversos estudos moleculares, principalmente através da introdução de plataformas de sequenciamento de nova geração, devido à sua importância e amplo relacionamento com o hospedeiro humano. Entretanto, o armazenamento de amostras fecais antes da extração do DNA é crítico ao caracterizar a composição da microbiota intestinal. Com base nesses dados, o presente estudo buscou compreender os efeitos de diferentes métodos de armazenamento de amostras fecais para caracterizar a microbiota intestinal através do sequenciamento da nova geração, bem como estabelecer um método alternativo de conservação do material genético bacteriano nessas amostras, utilizando guanidina. **MÉTODO:** Foram coletadas amostras de fezes de 10 voluntários saudáveis. Cada amostra foi dividida em cinco alíquotas, uma alíquota extraída imediatamente após a coleta (fresca) e duas alíquotas submetidas ao congelamento, à temperaturas de -20°C e -80°C e extraídas após 48 horas. As outras duas alíquotas restantes foram armazenadas em guanidina à temperatura ambiente e a 4°C e extraídas após 48 horas. Para observar a presença de alterações na microbiota intestinal, durante um período de armazenamento maior das amostras de fezes, três amostras foram armazenadas em guanidina à temperatura ambiente e a 4°C e extraídas após o período de 60 dias. A região hipervariável v4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada por PCR. Os amplicons gerados foram sequenciados utilizando a plataforma Ion PGM Torrent e os dados analisados utilizando o software QIIME. A determinação da significância estatística foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. **RESULTADOS:** Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos níveis taxonômicos (filó, classe, família, ordem e gênero) entre amostras frescas analisadas e os métodos de armazenamento testados. As análises de coordenadas principais (PCoA) mostraram que as amostras se agruparam de acordo com os indivíduos analisados, tendo as amostras referentes a cada indivíduo agrupado-se com maior proximidade do que com outras amostras do mesmo grupo de armazenamento. **CONCLUSÃO:** Nossos dados sugerem que o congelamento e o uso de guanidina para armazenamento de amostras de fezes, para a caracterização da microbiota intestinal, podem efetivamente preservar o material genético bacteriano nessas amostras ao longo de um período de 48 horas para amostras submetidas ao congelamento e durante 60 dias para amostras armazenadas em guanidina.

Descritores: microbioma intestinal; sequenciamento de nova geração; guanidina; microbiota; armazenamento de substâncias, produtos e materiais; fezes; RNA ribossômico 16S.

ABSTRACT

Ribeiro RM. *Study of the effect of different methods of stool samples storage for gut microbiota characterization using next-generation sequencing* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUCTION: The gut microbiota has been the target of several molecular studies, mainly through the introduction of next generation sequencing platforms, due to its importance and wide relationship with the human host. However, the storage of fecal samples prior to DNA extraction is critical when characterizing the composition of the intestinal microbiota. Based on these facts, the present study aimed to understand the effects of different methods of storage of fecal samples to characterize the intestinal microbiota by next generation sequence, as well as establishing an alternative conservation method of the bacterial genetic material in these samples using guanidine. **METHODS:** Stool samples from 10 healthy volunteers were collected. Each collected sample was divided into five aliquots, one aliquot extracted immediately after collection (fresh) and two aliquots subjected to freezing at -20°C and -80°C temperatures and extracted after 48 hours. The others two remaining aliquots were stored in guanidine at room temperature and at 4°C and extracted after 48 hours. In order to observe the presence of alterations in the intestinal microbiota, during a longer storage period of the stool samples, three samples were stored in guanidine at room temperature and at 4°C and extracted after 60 day period. The v4 hypervariable region of bacterial and archeal 16S rRNA gene were amplified by PCR. The generated amplicons were sequenced using Ion PGM Torrent platform and the data analyzed using the software QIIME. Determination of statistical significance was performed using non-parametric Kruskal-Wallis test. **RESULTS:** No significant differences were found in any of the taxonomic levels (phylum, class, family, order and genus) between analyzed fresh samples and the others different storage methods. The principal coordinates analysis (PCoA) unweighted showed that the samples clustered based on the host each sample originated from, rather than by storage group. **CONCLUSION:** Our data suggest that both freezing and the use of guanidine to store stool samples for gut microbiota characterization can effectively preserve the bacterial genetic material in these samples over a 48 hours period for samples subjected to freezing and for up to 60 days for samples stored in guanidine.

Descriptors: gastrointestinal microbiome; next generation sequencing; guanidine; microbiota; storage of substances, products and materials; RNA, ribosomal, 16S

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1. A microbiota humana

Sempre que se fala em biodiversidade, pensamos geralmente na variedade de plantas e animais que habitam os diferentes ecossistemas. No entanto, nós humanos e outras espécies animais somos colonizados por uma rica e complexa diversidade de microrganismos. O conjunto destes microrganismos, que incluem as bactérias, fungos, vírus e protozoários denomina-se microbiota.

Existem aproximadamente 100 trilhões de microrganismos habitando a superfície interna e externa do corpo humano. Entretanto, a sua composição varia muito nas mais diversas regiões do nosso corpo, dependendo de condições como umidade, pH, temperatura e nutrientes disponíveis (Costello et al., 2009)

As comunidades microbianas são de vital importância para a saúde, e o seu estudo leva a um melhor conhecimento da sua dinâmica complexa, que ainda pode conduzir ao desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e até mesmo de tratamento de doenças. Assim, de uma forma simplista, a microbiota humana é o conjunto de microrganismos que habitam no organismo humano. Existe uma relação de simbiose entre o organismo humano e os microrganismos que aí residem (Lozupone et al. , 2012).

O papel dos microrganismos têm sido muito discutido nos últimos anos, tanto que um programa internacional, denominado "Projeto Microbioma Humano (HMP)" foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar a diversidade

da microbiota em humanos saudáveis e, desta forma, conhecer a composição da microbiota que habita o organismo humano (Turnbaug et al., 2007). É possível que alterações da microbiota possam levar a alergias, doenças auto-imunes, alguns tipos de câncer, doenças inflamatórias intestinais, autismo, obesidade, diabetes, depressão, entre outras patologias (Cani, 2013; Kamada et al., 2013; Vogtmann, Goedert, 2016).

1.2. A microbiota intestinal

A microbiota intestinal representa uma complexa e abrangente comunidade constituída por três grupos predominantes: Archaea, Bacteriae e Eucarya. A fração correspondente às bactérias compreende aproximadamente 500 espécies diferentes, com a extensa maioria residindo no cólon, onde a densidade pode chegar a 10^{12} células/mL (Ley, Peterson, Gordon, 2006; Whitman, Coleman, Wiebe, 1998). No total, a população microbiana no intestino é representada por 100 trilhões de células, carregando consigo uma diversidade genética 100 vezes maior do que a estabelecida pelo genoma humano (Dave et al., 2012).

1.3. O desenvolvimento da microbiota intestinal

A colonização inicial do trato gastrointestinal ocorre no decurso do parto, visto que durante a vida intrauterina o mesmo apresenta-se estéril. Tal colonização se dá através da exposição a microrganismos durante a passagem pelo canal vaginal e subsequente exposição a microrganismos presentes no

ambiente, sendo dominada pelos gêneros: *Lactobacillus*, *Prevotella*, e *Sneathia* spp. Em bebês nascidos por cesariana, a microbiota que compõe seus intestinos é descrita como sendo diferente da de bebês nascidos por parto natural, sendo dominada por bactérias presentes no ambiente hospitalar, como os gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium* spp. (Dominguez-Bello et al., 2011; Dominguez-Bello et al., 2010). Tal fato é considerado como um fator desfavorável, sugerindo que bebês nascidos por cesariana possuem uma maior suscetibilidade à infecção por certos patógenos, além de elevar o risco de doenças atópicas, tais como asma e alergias, em comparação com bebês nascidos por parto natural (Bager, Wohlfahrt, Westergaard, 2008).

As bactérias que compõem a microbiota intestinal de recém-nascidos, adquirida através do canal vaginal materno e pele, começa a ser substituída de maneira rápida, e até certo ponto, instável entre o primeiro e o terceiro ano de vida, convergindo lentamente à um padrão de microbiota intestinal tipicamente encontrado no adulto, dominada pelos filos Bacteroidetes (gram-negativas) e Firmicutes (gram-positivas), mais funcional e estável (Francino, 2014). Tal aumento na diversidade de microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal em crianças, pode se dar por conta da introdução de alimentos sólidos na dieta, haja visto que a microbiota durante o primeiro ano de vida é rica em genes que facilitam a digestão do lactato, enquanto a dieta de alimentos sólidos promove elevada produção de genes que codificam para a degradação de uma maior variedade de carboidratos, biossíntese de vitaminas e degradação de xenobióticos (Kurokawa et al., 2007; Koenig et al., 2011).

A alimentação durante as primeiras semanas de vida, é um fator

importante na colonização da microbiota intestinal. O leite materno é capaz de estimular o crescimento do gênero bacteriano *Bifidobacterium* e inibir o crescimento de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Escherichia coli*, diminuindo assim o quadro de gastroenterites em lactentes (Bezirtzoglou, 1997). Entretanto, apesar do estabelecimento da microbiota intestinal ocorrer ainda muito cedo, sua composição pode sofrer diversas alterações durante a vida do ser humano, por fatores como idade, dieta, localização geográfica, drogas, consumo de suplementos alimentares, além de outros fatores ambientais (Bäckhed et al., 2012).

1.4. Microbiota em adultos

Em circunstâncias normais, os microrganismos que compõem a microbiota intestinal humana são comensais, auxiliando na manutenção do sistema imune intestinal, através da produção de moléculas com atividade antimicrobiana que inibem diretamente a propagação de patógenos (Yoon, Lee, Yoon, 2014). Em razão de sua alta capacidade em manter a homeostase de seu sítio, a microbiota intestinal tem sido relacionada ao tratamento de diversas condições clínicas, tais como síndromes inflamatórias intestinais e infecções causadas por *Clostridium difficile*. Estudos demonstraram que o transplante de microbiota fecal, em pacientes que apresentam tais disfunções, é um método de tratamento eficaz, proporcionando notável melhora na qualidade de vida destes pacientes (Wei et al., 2015; Almeida, Gerbaba, Petrof, 2016).

Já em idosos, a microbiota intestinal é diferente da microbiota intestinal

de adultos jovens, apresentando uma proporção maior do filo Proteobacteria, que sobre algumas circunstâncias, é capaz de induzir patologias (Claesson et al., 2011; Biagi et al., 2010).

1.5. Alterações na microbiota intestinal

Algumas desordens metabólicas também foram relacionadas com alterações na composição da microbiota intestinal, tais como obesidade, Diabetes e doença hepática gordurosa não alcoólica (Cox, Blaser, 2013; Gülden, Wong, Wen, 2015; Gangarapu et al., 2014). A relação da microbiota intestinal nestas disfunções, se dá por conta da capacidade de modulação que a mesma exerce diante do acúmulo de lipídeos, lipopolissacarídeos e, principalmente pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, capazes de afetar a absorção dos alimentos, inflamação e sinalização de insulina (Hur, Lee, 2015).

Devido a sua importância e ampla relação com o hospedeiro humano, a microbiota intestinal foi alvo de diversos estudos moleculares ou baseados em cultura, principalmente através da utilização de amostras fecais, que diferentemente de amostras obtidas por meio de biópsias, não necessitam da realização de um processo invasivo para sua obtenção, além de abranger materiais, tais como células epiteliais esfoliadas que podem conter informações relevantes a respeito da microbiota do trato gastrointestinal (Roesch et al., 2009).

1.6. Análise molecular da microbiota

O advento da biologia molecular reduziu as limitações encontradas na utilização de métodos de cultivo, além de revelar novas perspectivas sobre a diversidade de microrganismos existentes na flora intestinal humana (Li et al., 2012). Além disso, a inclusão de tecnologias de sequenciamento de nova geração trouxe ainda mais avanços às análises de biodiversidade microbiológica, possibilitando a captação de dados de centenas até milhares de microrganismos, tornando desta forma os estudos mais abrangentes e confiáveis (Valverde, Mellado, 2013).

Assim, estudos de genética molecular foram empregados para identificação do microbioma humano, como o Projeto Microbioma Humano (HMP) iniciado em 2008, que teve por objetivo caracterizar e analisar as comunidades microbianas encontradas em vários locais do corpo humano, auxiliando na melhor compreensão da microbiota endógena humana, permitindo elucidar suas relações com o hospedeiro.

O principal alvo molecular para a análise das comunidades bacterianas é a sub-unidade menor do RNA ribossomal, 16S rRNA, que possui regiões de sequências de bases de nucleotídeos altamente conservadas no domínio bacteriano, intercaladas por regiões variáveis, altamente variáveis, que possibilitam estudos de caracterização filogenética de grupos e de espécies de bactérias (Tannock, 2002). Essas regiões são nomeadas de V1 a V9 (Figura 1). A partir da descoberta deste alvo, diversos métodos moleculares foram desenvolvidos para caracterizar a microbiota intestinal a partir de amostras de fezes, tais como os métodos de FISH, a

técnica de PCR em tempo real, além das técnicas de sequenciamento convencional e de nova geração, aonde as bactérias são identificadas a partir do seu material genético presente na amostra, independente de serem cultiváveis ou não (Favier et al., 2002; Zoetendal, Rajilic-Stojanovic, de Vos, 2008; Yarza et al., 2014).

De modo geral, a região V4 é a mais utilizada em estudos de microbioma, por representar fielmente o perfil taxonômico das comunidades microbianas, quando comparada à caracterização utilizando a sequência completa do gene 16S rRNA (Wang et al., 2007).

FONTE - Adaptado de Yarza et al., 2014

Figura 1 - Regiões variáveis do RNA ribossomal 16S. As regiões variáveis do RNA ribossomal 16S estão representadas por cores diferentes. Em vermelho estão representadas as regiões V1 e V2; em laranja, a região V3; em amarelo, a região V4; em verde, as regiões V5 e V6; em azul, as regiões V7 e V8; e em roxo, a região V9

A utilização do chamado sequenciamento de nova geração (NGS), no sequenciamento do gene 16S rRNA, foi crucial para viabilizar novas descobertas acerca da biodiversidade da microbiota intestinal (Rothberg et al., 2011). O sequenciador Ion Torrent PGM representa uma das mais novas plataformas de sequenciamento recentemente comercializadas, possuindo menor custo e retorno mais rápido, em comparação com outras plataformas de sequenciamento de nova geração, tais como 454 da Roche e as diferentes plataformas da Illumina (Milani et al., 2013). A aplicação da plataforma Ion Torrent nos estudos baseados em 16S rRNA foram amplamente descrita em diversos estudos, como na investigação da comunidade microbiana do rio Athabasca (Yergeau et al., 2012), na caracterização da microbiota subgengival (Jünemann et al., 2012), na avaliação de métodos de tratamento de água (Fujimoto et al., 2014), além da investigação da composição bacteriana no muco intestinal (Li et al., 2015).

1.7. Interferentes no sequenciamento

Um dos problemas mais comumente relacionados aos estudos de microbiota intestinal diz respeito aos métodos de armazenamento e estocagem das amostras de fezes, visto que a preservação do material genético é de suma importância para o sucesso da pesquisa (Cardona et al., 2012). Embora o congelamento das fezes ainda seja considerado o método mais eficaz para a preservação do material genômico bacteriano (Röder et al., 2010), este tipo de método dificilmente pode ser aplicado em pesquisas em campo, visto que nestes tipos de estudos, as amostras podem

permanecer durante longos períodos em temperatura ambiente, podendo introduzir variações indesejadas, devido a mudanças na comunidade causadas pelo crescimento ou morte celular diferencial e o potencial de degradação de ácidos nucleicos, que podem resultar em previsões taxonômicas que não refletem com precisão a comunidade in vivo no momento da coleta da amostra (Vlčková et al., 2012; Klymiuk et al., 2016).

Ainda que alguns estudos já tenham sido realizados, buscando demonstrar as alterações encontradas na microbiota intestinal humana a partir do método de armazenamento das fezes, os achados reforçam a necessidade de se estabelecer métodos alternativos para a conservação das amostras fecais para o estudo da microbiota intestinal.

Diversos outros métodos têm sido descritos, buscando tornar o processo de coleta de amostras de fezes para estudos de microbioma mais simplificado, como o estudo de Vlčková et al., 2012, que utilizou uma substância estabilizante além de outros estudos que utilizaram diferentes tampões de conservação, como OMNIGene.GUT, Tris-EDTA (Choo, Leong, Rogers, 2015) e etanol (Blekhman et al., 2016), abrindo possibilidades para realização de uma série de estudos em campo que, de outro modo, seriam custo-proibitivos. Recentemente um estudo de Vogtmann et al 2016, demonstrou que o uso de cartões de teste para pesquisa de sangue oculto nas fezes são uma ótima opção para a conservação das amostras fecais. Ademais, este tipo de técnica pode ser utilizado em estudos de larga escala, podendo ser facilmente enviado por correio aos participantes da pesquisa.

Este estudo propõe a utilização de uma substância caotrópica, a guanidina/EDTA, que já foi descrita como denaturante (Chomczynski, Sacchi,

2006). A solução de guanidina/EDTA consiste em uma substância que permite manter a integridade do DNA de protozoários, como o *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue para estudos de biologia molecular, sendo capaz de estabilizar o DNA do parasita e romper células (Dorn, Selgean, Guillot, 1997; Avila et al., 1993). Entretanto, nunca se testou a utilização da guanidina em amostras de fezes para o estudo de microbioma, podendo tal substância, preservar o material genômico bacteriano e, desta forma, viabilizar a coleta das amostras em locais aonde o congelamento não é possível.

Sendo assim, o presente estudo buscará um método alternativo ainda não testado para a conservação de amostras fecais para estudo de microbioma, comparando quatro diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes, por meio do sequenciamento de nova geração, utilizando a plataforma Ion PGM Torrent, visto que ainda não há estudos descritos deste tipo de conservante, utilizando tal plataforma. Ademais, conhecer os efeitos de diferentes condições de armazenamento na microbiota fecal, determinado pelo sequenciamento na plataforma Ion PGM Torrent, é importante para projetos, análises e interpretações de estudos de microbioma utilizando este tipo de técnica.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Compreender os efeitos de diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes na caracterização da microbiota intestinal.

2.2 Objetivo específico

Estabelecer um método alternativo para a conservação de amostras de fezes, para o estudo da microbiota intestinal durante o armazenamento das amostras fecais.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Para a caracterização da microbiota intestinal, que possibilitou a comparação entre os métodos de armazenamento das amostras fecais, foi realizado um estudo de corte transversal de indivíduos saudáveis, com faixa etária de 20 a 60 anos.

3.2 Caracterização do local do estudo

O estudo e o trabalho experimental foram conduzidos e desenvolvidos no Laboratório de Investigação Médica de Parasitologia (LIM 46) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

3.3 População de estudo e seleção da casuística

3.3.1 Seleção dos casos

Foram coletadas amostras de fezes de 10 voluntários. Cada amostra consistiu em aproximadamente 20 gramas de fezes coletadas em frascos, que foram encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia Médica (LIM 46) do HCFMUSP, aonde foram processadas e identificadas.

3.3.2 Critérios de exclusão

- Voluntários com menos de 18 anos ou mais de 60 anos;
- Portadores de afecções do trato gastrointestinal (TGI) tais como hepatopatias, pancreatopatias, doença inflamatória intestinal, neoplasias do trato gastrointestinal;
- Voluntários submetidos a cirurgias prévias do TGI;
- Voluntários que utilizaram antibióticos nos últimos 60 dias;
- Voluntários com sintomas relacionados ao TGI baixo como diarreia crônica, constipação não compensada (em uso regular de laxantes), enterorragia, muco nas fezes, tenesmo;
- Voluntários submetidos à quimioterapia ou radioterapia por qualquer causa.

3.3.3 Aspectos éticos do estudo

De acordo com as normas que regem as pesquisas envolvendo seres humanos, foi elaborado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) que obedece às recomendações do Conselho Nacional de Saúde, através da Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012. O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, posteriormente, ao Comitê de Ética e Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo aprovado na data de 10 de dezembro de 2014, sob o número 0379/14.

3.4 Métodos

3.4.1 Método molecular para estudo da microbiota

A composição da microbiota intestinal foi estudada em amostras de fezes. As amostras foram coletadas em frascos especiais e encaminhadas ao LIM 46 do HCFMUSP aonde foram processadas. As amostras foram aliquotadas em 5 frascos diferentes. Parte das amostras foi processada e extraída em até 30 minutos após a coleta. Uma alíquota foi armazenada a -20°C e outra parte, armazenada a -80°C, durante o período de 48 horas até a extração. Outras duas frações foram aliquotadas com aproximadamente 15 mL de guanidina/EDTA, sendo uma das alíquotas armazenada à temperatura ambiente e a outra a 4°C, durante o período de 48 horas até a extração.

Para observar a presença de alteração na microbiota intestinal, durante um período de armazenamento maior das amostras de fezes, procedeu-se análise, à partir da extração do material de alíquotas de três amostras armazenadas em solução guanidina/EDTA, também durante um período de 60 dias, tanto à temperatura ambiente, quanto à 4°C.

Após a seleção, armazenamento e extração de DNA das amostras de fezes, foi realizada amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, seguida por sequenciamento, por meio da plataforma *Ion PGM Torrent* para a caracterização da microbiota intestinal e estudo do efeito dos diferentes métodos de armazenamento.

3.4.1.1 Extração de DNA das amostras fecais

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) das amostras de fezes, foi realizada com o kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante, porém com algumas modificações, que permitiram uma melhor adaptação do kit para a extração de amostras fecais, como descrito pelo Human Microbiome Project (*McInnes P, Cutting M: 2010, Manual of procedures for Human microbiome Project*).

Foram transferidos 0,25g de fezes a um tubo PowerBead, contido no kit, devidamente identificado. Seguindo instruções descritas pelo Human Microbiome Project, o tubo foi homogeneizado por agitação vigorosa durante 30 segundos. Após a realização deste procedimento, a reação foi incubada a 65°C, durante 10 minutos e em seguida, 95°C durante 10 minutos, permitindo a lise adequada da amostra.

Posteriormente à incubação, seguiram-se as recomendações descritas no manual do fabricante, aonde 60 µL da solução C1 (para a lise celular) foram adicionados ao tubo contendo a amostra. O tubo foi homogeneizado por inversão, diversas vezes e em seguida, submetido a agitação vigorosa na posição horizontal, durante 10 minutos e, posteriormente submetido a centrifugação a 10.000g por 30 segundos. Em seguida, 250 µL da solução C2 foi adicionada a reação, que foi incubada durante 5 minutos a 4°C. Em seguida, foi realizada centrifugação durante 1 minuto a 10.000g.

Seguinte ao processo de centrifugação, 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 2mL. Logo após, 200 µL da solução C3 foram adicionados, e a reação incubada durante 5 minutos a 4°C. Em seguida, foi

realizada centrifugação durante 2 minutos a 10.000g.

Após a centrifugação, 750 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 2 mL. Logo após, 1200 µL da solução C4 foram adicionados, e a reação homogeneizada por agitador orbital. A solução C4 consiste em uma solução salina de alta concentração, permitindo desta forma, a ligação do DNA à sílica e remoção de materiais contaminantes que possam estar presentes em baixa concentração.

Aproximadamente 675 µL da solução foram transferidos para uma coluna presente no kit e foi realizada centrifugação, durante 1 minuto a 10.000g. Em seguida, o conteúdo contido no tubo coletor foi descartado e o procedimento repetido por mais duas vezes, permitindo que toda a solução fosse processada através da coluna.

Posteriormente, 500 µL da solução C5 foram adicionados à coluna, que foi submetida à centrifugação a 10.000g durante 30 segundos. O conteúdo contido no tubo coletor foi removido e uma nova centrifugação procedida, a 10.000g durante 1 minuto.

Logo após a centrifugação, a coluna foi inserida em um tubo de 2 mL e, 100 µL da solução C6 (que por eluição permite que as moléculas de interesse sejam adsorvidas a coluna) foram adicionados diretamente ao centro da membrana da coluna. A coluna foi submetida a uma nova centrifugação, durante 30 segundos a 10.000g.

O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a realização do procedimento de quantificação do DNA e amplificação das sequências-alvo.

3.4.1.2 Quantificação do DNA

A quantificação de DNA foi realizada utilizando o fluorímetro de Qubit® 2.0 da empresa Invitrogen™. O fluorímetro de Qubit® é capaz de quantificar DNA, RNA e proteínas, com a utilização de fluorescência ultra-sensível e precisa. O cálculo dessa quantificação, baseia-se na relação entre dois padrões utilizados na calibração do aparelho e que geram um ajuste de curva algorítmica. A quantificação do DNA extraído do material fecal foi realizada utilizando-se o Qubit® dsDNA BR Assay Kit.

Em um tubo de 0,5 mL foram adicionados 198 µL da Working Solution (199 µL de Qubit® dsDNA BR Buffer e 1 µL de Qubit® dsDNA BR Reagent) e 2 µL do DNA e agitou-se por 2 segundos. Após um período de incubação de 2 minutos a temperatura ambiente, a quantificação foi realizada através do aparelho. O kit Qubit® dsDNA BR Assay Kit permite leituras que podem variar de 100 pg/µL até 1.000 ng/µL.

3.4.1.3 Amplificação das regiões-alvo

A caracterização da microbiota intestinal foi realizada pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 (5'-CACGGTCGKCGGCGCCATT-3') e R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2011). Esses oligonucleotídeos foram modificados para conter uma região de adaptadores, permitindo o sequenciamento na plataforma *Ion PGM Torrent*. Além disso, um dos iniciadores (*primer forward*) foi marcado com sequências de nucleotídeos

(código de barras), que permitiram a colocar até 16 amostras em uma mesma reação de sequenciamento, de acordo com a cobertura desejada (250 mil leituras por amostra). Desta forma, a amplificação realizada à partir da utilização dos oligonucleotídeos descritos acima, permitiu gerar um produto de aproximadamente 370 pares de bases. As sequências dos oligonucleotídeos contendo os adaptadores e *código de barras* que foram utilizados para realização da técnica é apresentada no Anexo A.

Para cada par de iniciadores, volumes iguais dos mesmos foram misturados, obtendo uma solução estoque de 10 μ M.

O reagente Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen™) foi utilizado para a etapa de amplificação das regiões-alvo. Este reagente contém uma mistura de DNA polymerase, sais, magnésio e dNTP's, permitindo uma rápida e eficiente amplificação dos produtos, haja visto que esta enzima possui uma menor taxa de erros comparada a outras enzimas disponíveis no mercado.

O DNA extraído de cada alíquota foi diluído para que se pudesse obter a concentração de 50 ng em um volume de 4 μ L.

Em um tubo de 0.2mL, foram adicionados 45 μ L de Platinum® PCR SuperMix High Fidelity, 4 μ L de DNA genômico, além de 1 μ L da solução estoque de 10 μ M de primers.

As condições para a amplificação das regiões-alvo do segmento V4 do gene 16S ribossomal, utilizando um termociclador Verity (Applied Biosystems) foram as seguintes:

- Um ciclo de 94°C, para a ativação da enzima, durante 3 minutos;
- Seguido de 40 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30

segundos e 60°C durante 1 minuto.

3.4.1.4 Purificação dos produtos de PCR

Para a realização da purificação da biblioteca, o reagente Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter) foi utilizado, permitindo uma remoção eficiente de dNTPs e iniciadores não ligados à reação, dímeros de iniciadores, sais, além de outros contaminantes, a partir da utilização de pérolas magnéticas, que atraem os produtos de PCR, separando-os dos outros materiais.

O processo de purificação à partir da utilização de pérolas magnéticas, consiste em imobilização reversível em fase sólida, aonde as pérolas são constituídas por poliestireno coberto por magnetita, que por sua vez é revestida por uma camada de carboxilato. Esse composto se liga de forma reversível ao DNA, na presença de polietileno-glicol (PEG) e sal, presentes na solução (20% de PEG, 2,5 M de NaCl). O PEG faz com que o DNA carregado negativamente, se ligue com os grupos carboxila na superfície da pérola. Como a imobilização é dependente da concentração de PEG e sal na reação, a relação volumétrica da solução / DNA é crítica.

Em um tubo 1.5 mL, devidamente identificado, foram adicionados 90 µL do reagente Agencourt® AMPure® XP Reagent, juntamente com 50 µL do produto de PCR de cada amostra. A mistura foi incubada durante 5 minutos, a temperatura ambiente, para a ligação do DNA às beads magnéticas.

Ao final da incubação, os tubos foram posicionados em estante magnética DynaMag™-2 Magnet (Invitrogen™), durante 2 minutos, até a

solução apresentar-se límpida. Cuidadosamente, o sobrenadante foi removido e 300 μL de etanol 70% recém-preparado foram adicionados, e a reação incubada por 30 segundos. Ao término da incubação, o sobrenadante foi removido e o procedimento de lavagem repetido por mais uma vez.

Toda a solução de etanol do tubo foi removida e, em seguida, o tubo foi mantido em estante magnética para que ocorra a secagem das pérolas, por meio de incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Após a incubação, 20 μL de TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) foram adicionados a cada tubo contendo a amostra, que foi posteriormente homogeneizado com o auxílio da pipeta por 5 vezes. O tubo foi posicionado novamente em estante magnética e incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Ao final, o sobrenadante contendo a biblioteca amplificada foi transferido para um novo tubo, devidamente identificado.

3.4.1.5 Preparo da mistura equimolar dos produtos amplificados

Após purificação dos produtos amplificados, as amostras foram quantificadas com através da utilização do fluorímetro de Qubit[®] 2.0 da empresa Invitrogen[™], utilizando-se o Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit.

Em um tubo de 0,5 mL foram adicionados 198 μL da Working Solution (199 μL de Qubit[®] dsDNA HS Buffer e 1 μL de Qubit[®] dsDNA HS Reagent) e 2 μL do DNA e agitou-se por vórtex, durante 2 segundos. Após um período de incubação de 2 minutos a temperatura ambiente, a quantificação foi realizada através do instrumento. O kit Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit permite leituras que

podem variar de 0,2ng/ μ L até 100ng/ μ L.

Em seguida, após quantificação, todas as amostras foram diluídas para conter 310 milhões de moléculas/ μ L, baseando-se no tamanho médio dos fragmentos gerados.

Após diluição de todas as bibliotecas, as mesmas foram misturadas em volumes iguais para a realização da PCR em emulsão.

3.4.1.6 PCR em emulsão e enriquecimento

A etapa de PCR em emulsão foi realizada para que os fragmentos de DNA pudessem ser amplificados ao redor das IonSphere™ Particles, antes da deposição das mesmas ao chip semicondutor para o sequenciamento.

Esta etapa foi realizada com o kit Ion PGM Template OT2 400 kit (Life Technologies), conforme instruções do fabricante.

Em um tubo EppendorfLoBind® 1,5mL, a solução de amplificação foi preparada, a partir da adição de 500 μ L de Ion PGM™ Template OT2 400 Reagent Mix, 285 μ L de Ion PGM™ Template OT2 400 PCR Reagent B, 50 μ L de Ion PGM™ Template OT2 400 Enzyme Mix, 40 μ L de Ion PGM™ Template OT2 400 Reagent X, além de 25 μ L da mistura equimolar dos produtos amplificados e 100 μ L das IonSphere™ Particles.

Após o preparo da solução de amplificação, a mesma foi depositada em um filtro “Ion PGM™ OneTouch Plus ReactionFilter Assembly”, contido no kit Ion PGM Template OT2 400 kit (Life Technologies), juntamente com 1.000 μ L de Ion OneTouch™ Reaction Oil. Em seguida, o filtro foi instalado no equipamento Ion OneTouch2, para a realização da etapa de PCR em emulsão.

Ao final da reação no equipamento "Ion OneTouch2", a suspensão obtida em dois tubos foi transferida para um único tubo, para o enriquecimento da amostra.

O enriquecimento foi realizado com o intuito de remover as partículas "IonSphere™ Particles" que não possuem DNA envolto em sua superfície, o que acarretaria em um sequenciamento inadequado. O processo foi realizado com o kit Ion PGM Template OT2 400 kit (Life Technologies), conforme instruções do fabricante, utilizando o equipamento Ion OneTouch ES™.

O processo consiste na utilização de pérolas magnéticas de estreptavidina que se aderem ao adaptador A do fragmento de DNA. Ao final da reação, adiciona-se uma solução contendo NaOH (Melt-Off) para desestabilizar a dupla-fita de DNA, para a posterior realização da reação de sequenciamento.

3.4.1.7 Reação de sequenciamento

A etapa de sequenciamento foi realizada com o kit Ion PGM™ Sequencing 400 kit (Life Technologies) e a plataforma Ion PGM™ Torrent (ThermoFisher Scientific), conforme instruções do fabricante.

Em um tubo de 0.2 mL contendo a amostra enriquecida, foram adicionados 5 µL do reagente "Control IonSphere™ Particles". Em seguida, procedeu-se centrifugação a 15.500g, durante 2 minutos e o sobrenadante foi removido, conservando-se apenas 15 µL de volume da solução.

Em seguida, 12 µL do reagente "Sequencing Primer" foram adicionados e realizou-se uma ciclagem em termociclador Veriti (Life Technologies), para a

incorporação do primer à sequência de DNA por 95°C durante 2 minutos e 37°C durante 2 minutos.

Após a ligação do “Sequencing Primer”, 3 µL do reagente “Ion PGM™ Sequencing 400 v2 Polymerase”, foram adicionados à reação e a mesma foi incubada à temperatura ambiente, durante 5 minutos.

Após a incubação, todo o volume da reação foi inserido em um chip Ion 318™ Chip v2 (ThermoFisher), seguindo instruções do fabricante. Após a realização do carregamento do chip, o mesmo foi inserido ao aparelho Ion PGM Torrent (ThermoFisher) e o sequenciamento foi realizado.

3.4.1.8 Processamento de dados, anotação e análise estatística

Após o sequenciamento, as sequências geradas pela plataforma Ion PGM Torrent (ThermoFisher) foram filtradas utilizando o software Torrent Browser, para a remoção de sequências policlonais e de baixa qualidade, e os dados filtrados foram exportados em formato FastQ para a ferramenta de análise USEARCH 7, para a separação das amostras, a partir dos código de barras inseridos anteriormente. As sequências foram agrupadas em Unidades Operacionais Taxonômicas (OTU's), baseando-se em similaridade de 97%, utilizando o algoritmo UCLUST na ferramenta de análise Qiime. As OTUs foram classificadas taxonomicamente, com o software QIIME, utilizando como referência o banco de dados do Greengenes. Bactérias presentes em abundância relativa menor do que 0,01% foram excluídas da análise. Em seguida, as análises de alfa e beta diversidades foram conduzidas no software QIIME, por meio do script "core_diversity_analyses.py".

Para determinar a presença ou ausência de diferenças estatisticamente significativas nas populações microbianas entre as 3 formas de armazenamento, o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi realizado utilizando o pacote do software estatístico GraphPad Prism 6. A significância estatística foi aceita para um valor de $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise da microbiota intestinal

4.1.1 Caracterização da microbiota intestinal em diferentes métodos de armazenamento por um período de 48 horas

A caracterização da microbiota intestinal em diferentes métodos de armazenamento das amostras fecais, durante o período de 48 horas, foi realizada com base na análise dos resultados da identificação de 11.494.688 sequências filtradas pelo software Torrent Browser, gerando em média, 229.894 sequencias por amostra.

Os participantes da pesquisa foram, predominantemente do sexo feminino (80%), com idade variando entre 28 à 56 anos (média: 26 anos; desvio-padrão: 10 anos. A maioria dos participantes apresenta nível superior completo (69,2%). Nenhum dos voluntários utilizou antibióticos no mês anterior à coleta da amostra (Tabela 1).

Tabela 1 - Estatísticas descritivas dos participantes do estudo

Característica	Participantes (n =10)
Idade (anos)	
Média	36
Desvio Padrão	13,2
Sexo	
Masculino	5 (50%)
Feminino	5 (50%)
Escolaridade	
Nível médio ou inferior	3 (30%)
Nível superior completo	3 (30%)
Pós graduação stricto sensu	4 (40%)
Raça/Etnia	
Brancos não-hispânicos	10 (100%)
Índice de massa corporal (IMC)	
Média	33
Desvio-padrão	11,3

A análise das sequências geradas demonstrou a presença de cinco filos principais entre os métodos de armazenamento das amostras de fezes analisados: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Fusobacteria. O filo Firmicutes foi o mais abundante nas amostras frescas, extraídas imediatamente após a coleta (50,8%) e também nos outros métodos de armazenamento, com exceção para as amostras armazenadas em guanidina a temperatura de 4°C, onde o filo mais abundante foi Bacteroidetes

(47,3%).

Apesar de diferenças de proporção do filo Bacteroidetes terem sido observadas entre as amostras frescas (42,8%), amostras submetidas ao congelamento a -20°C e -80°C (36,2% e 39,8% respectivamente) e as amostras armazenadas em guanidina a 4°C e à temperatura ambiente (47,3% e 44,2% respectivamente), tais diferenças não foram significativas ($p = 0,630$). O mesmo foi observado nas bactérias pertencentes aos filos Firmicutes ($p = 0,447$), Actinobacteria ($p = 0,631$) e Fusobacteria ($p = 0,935$). O filo Proteobacteria apresentou diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os cinco grupos ($p = 0,019$). Entretanto, ao compararmos os grupos separadamente, diferenças significativas para este filo somente foram encontradas ao compararmos as amostras submetidas ao congelamento com as amostras armazenadas em guanidina ($p = 0,013$), visto que na comparação entre as amostras frescas frente as submetidas ao congelamento, diferenças significativas não foram observadas ($p = 0,262$), assim como ao compararmos as amostras frescas com as submetidas ao armazenamento com guanidina ($p = 0,242$). As proporções e valores estatísticos pertencentes a cada filo estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Abundância relativa dos principais filos encontrados nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.

	Fresca	Freezer -20°C	Freezer -80 °C	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Bacteroidetes	42,80%	36,20%	39,80%	47,30%	44,20%	0,630
Firmicutes	50,80%	58,80%	54,90%	45,60%	47,10%	0,447
Preotobacteria	2,80%	2,20%	2,20%	3,80%	4,30%	0,019
Fusobacteria	1,60%	0,40%	0,50%	1,10%	1,70%	0,935
Actinobacteria	1,40%	2,00%	2,10%	1,30%	2,00%	0,631
Outros	0,60%	0,40%	0,50%	0,90%	0,70%	

Clostridia foi a classe mais abundante, representando de 44,5% a 54,6% das OTUs das amostras armazenadas em guanidina a temperatura ambiente e submetidas ao congelamento a -20°C, respectivamente. Nas amostras frescas, a classe Clostridia contemplou 47,6% das bactérias identificadas. A classe de bactérias Bacteroidia, pertencente ao filo Bacteroidetes, foi a classe mais representativa nas amostras armazenadas em guanidina a 4°C (47,3%) e a segunda classe mais abundante nas outras formas de armazenamento, inclusive nas amostras frescas, onde representou 42,8% das classes de bactérias identificadas. Outras classes, como Erysipelotrichi e Actinobacteria não apresentaram abundância relativa representativa, representando apenas 2,5% e 1,9%, respectivamente, das classes de bactérias encontradas.

As classes Clostridia e Bacteroidia não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,512$ e $0,630$ respectivamente). Entre as classes que apresentaram menor proporção, a única a apresentar diferença estatisticamente significante foi Betaproteobacteria ($p = 0,004$). Porém, ao

compararmos os grupos separadamente, as amostras frescas não apresentaram diferenças significativas em relação às amostras submetidas ao congelamento ($p = 0,186$) e armazenadas em guanidina ($p = 0,212$). As proporções e valores estatísticos pertencentes à cada classe se estão apresentados na tabela 3.

Três famílias de bactérias foram mais comumente identificadas: Bacteroidaceae (31,0%), Lachnospiraceae (23,5%) e Ruminococcaceae (18,7%) e não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados ($p = 0,895$, $0,213$ e $0,93$, respectivamente). Bacteroidaceae, pertencente à classe Bacteroidia foi a mais representativa nas amostras frescas (31,3%), armazenadas em guanidina, à temperatura ambiente (32,6%) e a 4°C (33,8%) e nas amostras submetidas ao congelamento a -80°C (29,7%). Nas amostras submetidas ao congelamento a temperatura de -20°C, a família mais representativa foi Lachnospiraceae, representando 29,7% das famílias identificadas, enquanto a família Bacteroidaceae foi identificada em 27,5% das OTUs.

Tabela 3 - Abundância relativa das principais classes encontradas nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.

	Fresca	Freezer -20°C	Freezer -80 °C	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Clostridia	47,66%	54,65%	51,18%	43,01%	44,58%	0,512
Bacteroidia	42,79%	36,17%	39,76%	47,32%	44,16%	0,630
Erysipelotrichi	2,53%	3,26%	3,05%	2,01%	1,91%	0,337
Betaproteobacteria	1,64%	0,81%	0,91%	2,81%	2,83%	0,004
Fusobacteriia	1,61%	0,39%	0,52%	1,14%	1,65%	0,975
Gammaproteobacteria	0,71%	0,88%	0,75%	0,36%	0,53%	0,893
Bacilli	0,64%	0,86%	0,71%	0,59%	0,57%	0,789
Mollicutes	0,35%	0,37%	0,33%	0,41%	0,33%	0,970
Deltaproteobacteria	0,28%	0,33%	0,43%	0,38%	0,63%	0,687
Alphaproteobacteria	0,20%	0,15%	0,12%	0,28%	0,35%	0,837
Lentisphaeria	0,12%	0,01%	0,01%	0,33%	0,38%	0,116
Outros	1,47%	2,12%	2,23%	1,36%	2,08%	

A única família a apresentar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foi Alcaligenaceae ($p = 0,004$). Entretanto ao analisarmos os grupos separadamente para esta família, diferenças não foram encontradas entre as amostras frescas versus as submetidas ao congelamento ($p = 0,161$) e entre as amostras frescas frente as amostras armazenadas em guanidina ($p = 0,212$). Diferenças estatisticamente significantes para este grupo, foram apenas encontradas ao compararmos as amostras armazenadas em guanidina frente às armazenadas por congelamento ($p = 0,003$). As proporções e valores estatísticos pertencentes à cada família, se encontram na tabela 4.

Tabela 4 - Abundância relativa das principais famílias encontradas nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.

	Fresca	Freezer -20°C	Freezer -80 °C	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Bacteroidaceae	31,36%	27,55%	29,75%	33,85%	32,64%	0,895
Lachnospiraceae	23,50%	29,77%	28,40%	17,04%	19,11%	0,213
Ruminococcaceae	18,76%	18,22%	16,55%	20,62%	19,74%	0,930
Prevotellaceae	6,85%	4,49%	4,42%	8,43%	6,55%	0,999
Erysipelotrichaceae	2,53%	3,26%	3,05%	2,01%	1,91%	0,337
Paraprevotellaceae	1,70%	1,54%	2,63%	1,71%	1,70%	0,984
Alcaligenaceae	1,63%	0,80%	0,90%	2,80%	2,82%	0,003
Bifidobacteriaceae	1,35%	1,95%	2,00%	1,22%	1,90%	0,968
Porphyromonadaceae	0,89%	0,82%	1,06%	0,74%	0,75%	0,560
Odoribacteraceae	0,85%	0,67%	0,66%	1,01%	1,15%	0,293
Clostridiaceae	0,83%	0,83%	0,62%	0,58%	0,45%	0,907
Veillonellaceae	0,83%	1,50%	1,24%	0,67%	0,52%	0,609
Enterobacteriaceae	0,57%	0,77%	0,66%	0,26%	0,42%	0,859
Rikenellaceae	0,45%	0,39%	0,49%	0,55%	0,49%	0,971
Barnesiellaceae	0,39%	0,36%	0,38%	0,56%	0,46%	0,807
Streptococcaceae	0,35%	0,55%	0,46%	0,25%	0,29%	0,521
Desulfovibrionaceae	0,28%	0,33%	0,43%	0,38%	0,63%	0,687
Christensenellaceae	0,11%	0,10%	0,12%	0,07%	0,11%	0,941
Outros	6,77%	6,10%	6,18%	7,25%	8,36%	-

As bactérias pertencentes aos gêneros Bacteroides, Faecalibacterium, Prevotella e Ruminococcus, foram as que apresentaram maior proporção entre

os grupos analisados. O gênero *Bacteroides* foi o mais abundante em todas as formas de armazenamento, representando de 27,5% nas amostras submetidas a congelamento à temperatura de -20°C , até 33,8% nas amostras armazenadas em guanidina a 4°C . Na amostra fresca, o gênero *Bacteroides* representou 31,3% da diversidade observada, não apresentando diferenças significativas entre os grupos de armazenamento analisados ($p = 0,63$), como mostra a tabela 5.

Entre os gêneros encontrados, diferenças significativas entre os 5 grupos foram apenas observadas no gênero *Suterella* ($p = 0,004$), entretanto não se observou diferença estatisticamente significativa ao compararmos as amostras frescas em relação às amostras armazenadas em guanidina ($p = 0,229$) e às amostras submetidas ao congelamento ($p = 0,161$).

Tabela 5 - Abundância relativa dos principais gêneros encontrados nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.

	Fresca	Freezer -20°C	Freezer -80 °C	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Bacteroides	31,36%	27,55%	29,75%	33,85%	32,63%	0,630
Faecalibacterium	8,86%	6,87%	6,45%	10,93%	9,84%	0,305
Prevotella	6,85%	4,49%	4,42%	8,43%	6,55%	0,999
Ruminococcus	5,65%	6,64%	5,47%	3,31%	4,12%	0,897
Blautia	3,92%	5,86%	5,47%	2,56%	3,39%	0,336
Coprococcus	2,05%	2,34%	2,26%	1,43%	1,39%	0,230
Roseburia	1,98%	2,39%	2,31%	1,69%	1,45%	0,992
Lachnospira	1,70%	1,31%	1,23%	1,35%	1,47%	0,585
Sutterella	1,63%	0,80%	0,90%	2,80%	2,82%	<0,001
Fusobacterium	1,61%	0,39%	0,52%	1,14%	1,65%	0,935
Bifidobacterium	1,35%	1,95%	2,00%	1,22%	1,90%	0,971
Dorea	0,92%	1,40%	1,26%	0,74%	0,87%	0,259
Parabacteroides	0,89%	0,82%	1,06%	0,74%	0,75%	0,560
Dialister	0,66%	1,27%	1,05%	0,59%	0,38%	0,893
Eubacterium	0,60%	0,45%	0,38%	0,46%	0,41%	0,496
Odoribacter	0,50%	0,38%	0,40%	0,68%	0,73%	0,191
Oscillospira	0,47%	0,43%	0,48%	0,46%	0,70%	0,834
Catenibacterium	0,35%	0,40%	0,23%	0,18%	0,24%	0,974
Butyricimonas	0,35%	0,29%	0,26%	0,33%	0,41%	0,421
Paraprevotella	0,35%	0,38%	0,41%	0,24%	0,32%	0,957
Streptococcus	0,33%	0,52%	0,44%	0,23%	0,27%	0,478
Anaerostipes	0,21%	0,17%	0,17%	0,18%	0,16%	0,974

Tabela 5 - Abundância relativa dos principais gêneros encontrados nas amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente - conclusão.

	Fresca	Freezer -20°C	Freezer -80 °C	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Bilophila	0,17%	0,22%	0,31%	0,19%	0,35%	0,644
Lactobacillus	0,17%	0,13%	0,09%	0,21%	0,12%	0,938
Haemophilus	0,14%	0,08%	0,08%	0,07%	0,07%	0,979
Desulfovibrio	0,11%	0,10%	0,12%	0,18%	0,28%	0,942
Outros	26,82%	32,37%	32,48%	25,80%	26,73%	-

4.1.1.1 Análise da Alfa Diversidade

Os índices de Alfa Diversidade foram estabelecidos para determinar se alterações na diversidade microbiana poderiam ocorrer como resultado do armazenamento das amostras de fezes em diferentes condições.

O gráfico de rarefação de espécies observadas indicou que o número de leituras analisadas das microbiotas estudadas não permitiu a determinação completa da diversidade existente, entretanto foi possível observar acentuada mudança na inclinação das curvas de rarefação no ponto referente ao número aproximado de 1.000 leituras analisadas (Figura 2).

Figura 2 - Gráfico de alfa rarefação, demonstrando o número de espécies observadas em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente

Apesar da curva de rarefação de espécies observadas não ter indicado a completa amostragem da diversidade existente nas amostras, mesmo após a análise de mais de 13.000 sequências, o cálculo do índice de Shannon demonstrou haver pouca variação na diversidade estimada entre as amostras analisadas nas diferentes condições de armazenamento (figura 3).

Figura 3 - Gráfico de alfa rarefação do índice de Shannon, em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas, armazenadas a -20°C, -80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente

O cálculo do índice de Diversidade Simpson também comprovou a baixa diversidade encontrada nas amostras frente aos métodos de armazenamento, ao demonstrar a alta probabilidade de dois indivíduos, selecionados de forma randômica dentro de uma mesma amostragem, pertecerem à mesma espécie (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico de alfa rarefação do índice de Simpson, em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas, armazenadas a -20°C, -80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente

A estimativa de riqueza total contida nas amostras analisadas foi descrita a partir da análise de Chao1, baseando-se no número de espécies raras encontradas, a partir da análise da abundância das espécies. A análise de Chao 1 demonstrou que o número de espécies que realmente podem compor a microbiota nas comunidades analisadas, é maior do que a descrita pela análise do número de espécies observadas (Figura 5).

Figura 5 - Gráfico de alfa rarefação do índice de Chao1, demonstrando a estimativa de riqueza total à partir do número de espécies observadas, em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente

A análise de Alfa Diversidade não demonstrou diferenças significativas entre os grupos de armazenamento analisados nas diferentes amostras, como mostra a tabela 6.

Tabela 6 - Estimativa da Alfa-Diversidade para as amostras frescas, armazenadas a - 20°C, - 80°C, guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente.

	Fresca	Freezer -20°C	Freezer -80 °C	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Estimativa de Riqueza Chao1	302	331	318	318	325	0,996
Índice de Shannon	5,26	5,33	5,32	5,21	5,32	0,988
Índice de Diversidade Simpson	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,916
Número de Espécies Observadas	241	258	258	244	257	0,901

4.1.1.2 Análise da Beta Diversidade

Análises da diversidade entre as microbiotas intestinais dos diferentes indivíduos frente às diversas formas de armazenamento, foram realizadas levando-se em conta a abundância das diferentes unidades taxonômicas identificadas e suas relações filogenéticas (Unifrac ponderado), e também não levando em consideração estas informações (Unifrac não-ponderado).

A análise de diversidade Unifrac não-ponderado demonstra uma medida qualitativa, diferenciando as comunidades pelos organismos que podem existir em cada amostragem.

A variação explicada pelas variáveis nos diversos eixos de PCoA associado às análises de Unifrac não-ponderado foi baixa, inferior a 20%, entretanto, mesmo com esta baixa variação, foi possível observar que as amostras se agruparam de acordo com os indivíduos analisados, tendo as cinco alíquotas do mesmo indivíduo agrupado-se com maior proximidade do que com outras amostras do mesmo grupo de armazenamento (Figura 6A e B).

Figura 6 - Visualização da análise PCoA baseada na matriz de distância Unifrac não-ponderada. A por indivíduo; B por tipo de armazenamento.

Ao levarmos em consideração a abundância relativa das OTUs a partir da análise comparativa de diversidade das amostras pelo método Unifrac

baleanceado, foi possível observar uma variação mais alta em relação à análise pelo método Unifrac não-ponderado. A variação explicada nos diversos eixos do gráfico de coordenadas principais foi de 51% no eixo PC1, e de 14% no eixo PC2.

De toda forma, também foi possível observar que as amostras analisadas se agruparam com maior proximidade, de acordo com os indivíduos analisados do que com outras amostras do mesmo grupo de armazenamento. (Figura 7A e B).

Figura 7 - Visualização da análise PCoA baseada na matriz de distância Unifrac ponderada. A- por indivíduo; B- por tipo de armazenamento

4.1.2 Caracterização da microbiota intestinal das amostras armazenadas em guanidina por um período de 60 dias

A caracterização da microbiota intestinal foi também analisada à partir de três amostras armazenadas em solução guanidina/EDTA (temperatura ambiente e à 4°C), durante um período de 60 dias antes da extração e processamento, buscando-se observar a presença de alteração na microbiota intestinal, durante um período de armazenamento maior das amostras de fezes. Os resultados foram comparados com as análises de alíquotas das mesmas amostras frescas, extraídas logo após a coleta.

Foram identificadas 2.223.495 sequências filtradas pelo software Torrent Browser, gerando em média, 247.055 sequencias por amostra. A análise das sequências geradas demonstrou a presença de cinco filos principais entre os métodos de armazenamento das amostras de fezes analisados: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Lentisphaerae.

O filo Firmicutes foi o mais abundante nas amostras frescas (58,6%) e também nas amostras armazenadas durante 60 dias à temperatura ambiente e à 4°C (71,2% e 61,3% respectivamente), seguida do filo Bacteroidetes, representado por 36,7% nas amostras frescas, 21,3% nas amostras armazenadas em guanidina à temperatura ambiente por 60 dias e 33,8% nas amostras armazenadas em guanidina à 4°C durante 60 dias. Com isto, é possível inferir que o período de armazenamento maior não influenciou na abundância dos principais filos encontrados nestas amostras, aonde diferenças estatisticamente significantes não foram encontradas entre as amostras frescas e armazenadas durante 60 dias em guanidina. As proporções e valores

estatísticos pertencentes a cada filo estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Abundância relativa dos principais filos encontrados nas amostras frescas e armazenadas em guanidina à temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.

	Fresca	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Bacteroidetes	36,70%	33,80%	21,30%	0,579
Firmicutes	58,60%	61,30%	71,20%	0,579
Preotobacteria	2,80%	3,20%	3,20%	0,954
Lentisphaerae	0,20%	0,60%	1,00%	0,368
Actinobacteria	1,20%	0,90%	2,50%	0,640
Outros	0,50%	0,20%	0,80%	

Dentre as classes de bactérias encontradas, Clostridia foi a mais abundante, sendo representada por 54,5% das OTUs encontradas nas amostras frescas, 58,3% nas amostras armazenadas em guanidina à 4°C durante 60 dias e 66,6% nas amostras armazenadas em guanidina à temperatura ambiente durante 60 dias. Apesar da diferença na abundância relativa destas bactérias frente aos métodos testados, não houve diferença significativa entre as classes mais abundantes presentes nas amostras analisadas, Clostridia ($p = 0,751$) e Bacteroidia ($p = 0,579$).

Diferenças significativas entre as classes de bactérias não foram encontradas entre as amostras frescas e armazenadas em guanidina durante o período de 60 dias, mesmo para as classes com menor representação (Tabela 8).

Tabela 8 - Abundância relativa das principais classes encontradas nas amostras frescas e armazenadas em guanidina à temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.

	Fresca	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Clostridia	54,50%	58,30%	66,60%	0,751
Bacteroidia	36,90%	33,80%	21,40%	0,579
Betaproteobacteria	2,30%	2,40%	1,90%	0,830
Erysipelotrichi	3,00%	2,20%	4,00%	0,407
Actinobacteria	1,10%	0,80%	2,40%	0,640
Bacilli	1,00%	0,80%	0,70%	0,340
Deltaproteobacteria	0,50%	0,60%	1,10%	0,152
Lentisphaeria	0,20%	0,60%	1,00%	0,751
Mollicutes	0,30%	0,20%	0,60%	0,887
Gammaproteobacteria	0,10%	0,10%	0,20%	0,835
Outros	0,10%	0,20%	0,10%	

Ruminococcaceae foi a família de bactérias mais abundante, representando de 29,5% a 36,1% das OTUs das amostras armazenadas em guanidina a temperatura ambiente durante 60 dias e a 4°C, respectivamente. Nas amostras frescas, a mesma família foi representada por 32,7% das bactérias identificadas.

A família Bacteroidaceae, pertencente ao filo Bacteroidetes e classe Bacteroidia, foi a segunda família de bactérias mais representativa nas amostras armazenadas em guanidina a 4°C (28,7%) e também nas amostras frescas (27,5%), entretanto nas amostras armazenadas durante 60 dias à temperatura ambiente, a segunda família mais representativa foi

Lachnospiraceae (28,7%).

As famílias Ruminococcaceae, Bacteroidaceae e Lachnospiraceae não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,619$, $0,657$ e $0,305$ respectivamente). Proporções e valores estatísticos pertencentes à cada família são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Abundância relativa das principais famílias encontradas nas amostras frescas e armazenadas em guanidina à temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.

	Fresca	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Ruminococcaceae	32,70%	36,10%	29,50%	0,619
Bacteroidaceae	27,50%	28,70%	18,00%	0,657
Lachnospiraceae	21,20%	17,40%	28,70%	0,305
Erysipelotrichaceae	3,00%	2,20%	4,00%	0,407
Alcaligenaceae	2,20%	2,40%	1,80%	0,830
Bifidobacteriaceae	1,10%	0,80%	2,30%	0,640
Veillonellaceae	1,90%	1,60%	1,00%	0,657
Prevotellaceae	0,50%	1,30%	1,90%	0,954
Porphyromonadaceae	1,40%	1,40%	1,00%	0,887
Odoribacteraceae	0,80%	1,00%	1,10%	0,954
Desulfovibrionaceae	0,50%	0,60%	1,10%	0,152
Rikenellaceae	0,30%	0,40%	1,40%	0,835
Paraprevotellaceae	0,80%	0,40%	0,60%	0,619
Barnesiellaceae	0,40%	0,40%	0,40%	0,835
Clostridiaceae	0,30%	0,20%	0,60%	0,189
Streptococcaceae	0,20%	0,20%	0,30%	0,619
Enterobacteriaceae	0,10%	0,10%	0,20%	0,983

Tabela 9 - Abundância relativa das principais famílias encontradas nas amostras frescas e armazenadas em guanidina à temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias - conclusão.

	Fresca	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Christensenellaceae	0,10%	0,10%	0,20%	0,834
Outros	5,00%	4,70%	5,90%	

Os gêneros *Bacteroides* e *Faecalibacterium* foram os mais representativos nos 3 grupos analisados, sendo que todos os gêneros encontrados nas amostras frescas, foram também identificados nas amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias, em níveis de abundância relativa semelhantes.

Enquanto o gênero *Bacteroides* foi o mais abundante nas amostras frescas (32,7%) e armazenadas em guanidina à 4°C durante 60 dias (28,7%), o gênero *Faecalibacterium* foi o mais abundante nas amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias à temperatura ambiente (24%), seguida pelo gênero *Bacteroides* (20,9%). De toda forma, diferenças significativas não foram encontradas frente aos métodos de armazenamento analisados e as amostras frescas para os dois gêneros mais abundantes ($p = 0,657$ e $0,830$ para *Bacteroides* e *Faecalibacterium*, respectivamente), como mostra a tabela 10

Tabela 10 - Abundância relativa dos principais gêneros encontrados nas amostras frescas e armazenadas em guanidina a temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.

	Fresca	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Bacteroides	32,70%	28,70%	20,90%	0,657
Faecalibacterium	19,40%	26,30%	24,00%	0,830
Blautia	4,00%	3,30%	3,60%	0,835
Sutterella	2,20%	2,40%	1,90%	0,830
Coprococcus	2,70%	3,00%	3,50%	0,579
Ruminococcus	1,40%	3,20%	3,00%	0,579
Eubacterium	2,00%	1,50%	1,80%	0,568
Bifidobacterium	1,10%	0,80%	2,30%	0,640
Prevotella	0,50%	1,30%	1,70%	0,887
Dialister	1,70%	1,40%	0,80%	0,679
Parabacteroides	1,40%	1,40%	1,00%	0,887
Lachnospira	1,20%	0,40%	1,00%	0,209
Dorea	0,60%	0,70%	1,50%	0,751
Roseburia	0,80%	0,80%	0,80%	0,887
Lactobacillus	0,70%	0,50%	0,40%	0,340
Paraprevotella	0,80%	0,40%	0,50%	0,930
Butyricimonas	0,50%	0,40%	0,50%	0,679
Odoribacter	0,20%	0,60%	0,50%	0,954
Bilophila	0,20%	0,20%	0,40%	0,474
Streptococcus	0,20%	0,20%	0,30%	0,619
Anaerostipes	0,10%	0,10%	0,20%	0,407
Outros	25,60%	22,40%	29,40%	0,195

4.1.2.1 Análise da Alfa Diversidade

Os índices de Alfa Diversidade também foram estabelecidos nas amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias e amostras frescas, buscando determinar se o armazenamento das amostras de fezes poderia resultar em alterações na diversidade microbiana.

Assim como para as amostras analisadas durante o período de 48 horas, a análise de espécies observadas indicou, através do gráfico de rarefação, que o número de leituras analisadas das microbiotas estudadas não permitiu a completa determinação da diversidade existente, entretanto foi possível observar acentuada mudança na inclinação das curvas de rarefação no ponto referente ao número aproximado de 1.000 leituras analisadas (Figura 8).

Figura 8 - Gráfico de alfa rarefação, demonstrando o número de espécies observadas em relação ao número de sequências obtidas para as amostras frescas e armazenadas em guanidina à temperatura ambiente e 4°C durante 60 dias.

Assim como para as análises realizadas para as amostras armazenadas durante o período de 48 horas, as análises de Alfa Diversidade não demonstraram diferenças significativas entre os grupos de armazenamento em guanidina durante 60 dias e amostras frescas, como mostra a tabela 11.

Tabela 11 - Estimativa da Alfa-Diversidade para as amostras frescas, e armazenadas em guanidina a 4°C e guanidina à temperatura ambiente durante 60 dias.

	Fresca	Guanidina 4°C	Guanidina temperatura ambiente	Valor de p
Estimativa de Riqueza Chao1	300	333	334	0,651
Índice de Shannon	5,77	5,92	5,93	0,662
Índice de Diversidade Simpson	0,95	0,95	0,96	0,824
Número de Espécies Observadas	236	262	270	0,752

4.1.2.2. Análise da Beta Diversidade

Para determinar a presença de diferenças significativas na diversidade beta, com base no armazenamento das amostras, os plots PCoA foram construídos com base em matrizes de distância UniFrac ponderadas e não-ponderadas. Procurou-se investigar se amostras do mesmo indivíduo se agrupariam.

Conforme ilustrado na figura 9A, as amostras foram agrupadas de acordo com o indivíduo, tendo as 3 amostras de um mesmo doador se agrupado de forma mais próxima do que com outras amostras do mesmo grupo de armazenamento (Fig. 9B). O mesmo também ocorreu quando as análises de coordenadas principais foram construídas baseando-se nas matrizes de distância UniFrac ponderadas para as amostras frescas e armazenadas em guanidina durante o período de 60 dias (Figuras 10A e 10B).

Figura 9 - Visualização da análise PCoA baseada na matriz de distância Unifrac ponderada para amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias e amostras frescas. A- por indivíduo; B- por tipo de armazenamento

Figura 10 - Visualização da análise PCoA baseada na matriz de distância Unifrac não-ponderada para amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias e amostras frescas. A- por indivíduo; B- por tipo de armazenamento

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo não mostraram diferenças entre as formas de armazenamento analisadas e a composição da microbiota de uma maneira geral. Nossos resultados demonstraram que a abundância relativa das bactérias encontradas nas amostras frescas era semelhante à encontrada nas amostras congeladas a -20°C ou -80°C , e também com as amostras armazenadas em guanidina a 4°C e à temperatura ambiente. As maiores diferenças foram observadas entre amostras de diferentes indivíduos, em vez de diferentes métodos de armazenamento das fezes.

No presente estudo também buscou-se analisar amostras armazenadas em guanidina, tanto à temperatura ambiente quanto à 4°C , durante um período maior de tempo. Tanto os filos quanto os gêneros encontrados nas amostras frescas, foram também identificados nas amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias, em níveis de abundância relativa semelhantes. Sendo assim, diferenças significativas entre os grupos de armazenamento e a composição da microbiota fecal também não foram encontradas.

A avaliação da abundância das bactérias presentes, foi realizada para cada amostra. Observamos abundância relativa no filo Proteobacteria e família Alcaligenaceae semelhantes entre as amostras frescas e a com a solução de guanidina, seja mantida à temperatura ambiente, como mantida à 4°C durante o período de 48 horas, porém diferentes entre as amostras congeladas e armazenadas em guanidina. Estudos mostram que apesar de baixa prevalência no intestino, aumento no filo Proteobacteria pode estar associado à disbiose, com maior risco ao desenvolvimento de doenças (Shin, Whon, Bae, 2015).

Assim, é importante que a detecção dessas bactérias não seja subestimada.

Níveis mais elevados, embora não significativos, do filo Firmicutes nas amostras armazenadas durante 48 horas a -20°C e -80°C em comparação com as amostras frescas foram observados. Este resultado suporta estudos anteriores, que demonstraram uma proporção maior de Firmicutes em amostras congeladas, quando comparadas com amostras frescas (Fouhy et al., 2015). Já para as amostras armazenadas em guanidina durante o período de 48 horas, os níveis apresentados do filo Firmicutes foram mais baixos do que os encontrados nas amostras frescas, de toda forma, as diferenças encontradas não foram significativas.

A diversidade bacteriana relacionada às análises de alfa e beta diversidade, observada tanto para as amostras analisadas após o período de armazenamento de 48 horas, quanto para as amostras armazenadas em guanidina durante 60 dias, não apresentaram diferenças significativas frente às amostras frescas. Anteriormente, estudos utilizando a técnica de pirosequenciamento e a plataforma MiSeq da Illumina, também demonstraram que para amostras submetidas ao congelamento, as amostras se agruparam com base nos voluntários participantes da pesquisa, ao invés dos grupos de armazenamento aos quais essas amostras foram submetidas (Wu et al., 2010; Fouhy et al., 2015).

Vários estudos foram realizados, demonstrando a importância da conservação e armazenamento de amostras para avaliação da microbiota de fezes. Um estudo utilizando a tecnologia de pirosequenciamento do gene 16S rRNA, revelou que a estrutura filogenética da microbiota das fezes não sofre alterações significativas quando armazenadas em diversas temperaturas, em

um período de tempo entre três a quatorze dias (Lauber et al., 2010). Contudo, tal estudo não incluiu amostras obtidas imediatamente após a defecação. Desta forma, é possível que a microbiota intestinal tenha sido degradada rapidamente e, conseqüentemente mantido tal composição durante o período de tempo observado. Em outro estudo, também realizado por meio da técnica de pirosequenciamento, demonstrou-se que amostras de fezes armazenadas a -80°C durante seis meses, exibiam uma composição microbiana e diversidade que compartilhava maior similaridade com amostras processadas em até 30 minutos após a defecação (Carroll et al., 2012).

É amplamente aceito que a melhor forma de armazenamento para evitar a degradação das amostras é o congelamento (Roder et al., 2010). De uma maneira geral, não observamos diferenças após o congelamento, o que ratifica, como esperado, ser um ótimo método para conservação de amostras para obtenção de ácidos nucleicos. Isso tem sido observado principalmente nos grupos de bactérias com maior prevalência no material a ser estudado. O uso de conservantes químicos, como o proposto neste estudo deve ser avaliado para cada uso, pois para determinados tipos de bactérias podem ser mais sensíveis ao agente químico. Estudo de Vlčková et al., 2012 mostra que o uso de etanol foi melhor na conservação de Enterobacteriaceae, por exemplo.

Embora nosso estudo tenha somente avaliado as condições de armazenamento de amostras de fezes durante um período curto de tempo, outros estudos, que buscaram avaliar o armazenamento através de congelamento durante um período de tempo maior, também não encontraram alterações significativas na microbiota intestinal (Lauber et al., 2010; Fouhy et al., 2015). De toda forma, esperamos continuar a estudar essas amostras

fecais após meses e até anos frente aos métodos de armazenamento testados no presente estudo, utilizando a análise na plataforma de sequenciamento de nova geração Ion PGM Torrent, para determinar os efeitos à longo prazo de armazenamento de amostras sobre a microbiota fecal.

Uma das possíveis limitações do nosso estudo é que os participantes eram saudáveis, e o efeito dos métodos de coleta em amostras pode variar para pessoas com microbiota altamente disbiótica. No entanto, estudos anteriores incluíram pacientes com síndrome do intestino irritável e doença inflamatória intestinal (Kostic, Xavier, Gevers, 2014; Tedjo, Jonkers, Savelkoul, 2015) e, em geral, os pesquisadores não observaram diferenças entre os métodos de coleta e os grupos de doenças analisados.

Outro parâmetro que deve ser considerado ao avaliar possíveis interferentes nos resultados de estudos de microbioma é a técnica escolhida. Estudos utilizam desde métodos de cultivo, até o sequenciamento de nova geração através de semicondutores, como o utilizado neste estudo. Como qualquer método, o sequenciamento por semicondutores também apresenta algumas limitações, como erros de pareamento e detecção de homopolímeros, que devem ser levados em consideração de acordo com o tipo de estudo a ser realizado, como mostra o estudo de Salipante et al., 2014, comparando duas metodologias para estudos de microbioma. No entanto, uma série de abordagens, incluindo a otimização do pipeline de bioinformática, e o aumento da profundidade de cobertura, são em geral utilizados em análises baseadas neste tipo de método, buscando superar as deficiências da plataforma Ion Torrent (Loman et al., 2012). Além disso, no presente estudo foram realizadas somente análises baseadas na amplificação do gene 16S rRNA bacteriano.

Estudos futuros devem considerar como os métodos de coleta afetam análises distintas, como estudos utilizando o sequenciamento shotgun.

Sendo assim, com base nos resultados deste estudo, sugerimos que a guanidina pode ser usada para a conservação de amostras fecais para estudos de microbioma, se o congelamento de amostras não for possível ou problemática. A implementação deste tipo de técnica para a coleta e armazenamento de amostras de fezes para estudos de microbioma possibilita aos pesquisadores, a não necessidade da utilização de transporte de gelo seco em campo, bem como a redução da utilização de refrigeradores -20°C e -80°C , permitindo o armazenamento à temperatura ambiente e também removendo a introdução de possíveis interferentes, os quais ciclos de congelamento e descongelamento das amostras biológicas poderiam trazer. Este tipo de coleta também pode permitir estudos colaborativos, incluindo laboratórios em locais geográficos distintos em todo o mundo, reduzindo efeitos específicos de coleta de amostras e, principalmente, reduzindo custos.

6 CONCLUSÕES

- Os diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes para a caracterização da microbiota intestinal avaliados neste estudo não mostraram diferenças.
- A solução de guanidina mostrou ser um método alternativo eficaz para a conservação de amostras de fezes, para o estudo da microbiota intestinal.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi apresentado na forma de pôster no XIX Congresso Brasileiro de Infectologia, realizado de 26 a 29 de agosto de 2015, em Gramado – RS, tendo sido premiado na categoria melhor pôster.

ANEXOS

ANEXO A – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da região V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano

Nome do iniciador	Sequência
R806_trP1_rev	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGACTACHVGGGTWTCTAAT
F515_A_for_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC04	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC05	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC06	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC07	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC08	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGATAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC09	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTCGAATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD ()

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Estudo do efeito de diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes para a caracterização da microbiota intestinal, através de sequenciamento de nova geração.

2. PESQUISADOR : Ester Cerdeira Sabino

CARGO/FUNÇÃO: Professora Associada - INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 51785

UNIDADE DO HCFMUSP: Dep de Molestias Infecciosas e Parasitárias da USP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-
HCFMUSP**

01-Nos últimos anos, pesquisadores têm observado uma relação importante entre as bactérias do nosso intestino e a origem de doenças como a obesidade e o diabetes. Entretanto, ainda faltam muitas informações sobre quais bactérias são realmente importantes e de que maneira poderíamos interferir sobre elas, encontrando assim maneiras mais eficazes para tratar essas doenças (obesidade e diabetes). Um dos problemas mais comumente relacionados aos estudos de microbiota intestinal diz respeito aos métodos de armazenamento e estocagem das amostras de fezes, visto que a preservação do material genético é de suma importância para o sucesso da pesquisa. O objetivo desse estudo é compreender os efeitos de diferentes

métodos de armazenamento das amostras de fezes para a caracterização da microbiota intestinal, podendo desta forma, avaliar o melhor método para o armazenamento de fezes para estudos de microbiota.

02-Para fazer essa análise, serão colhidas fezes dos voluntários (como em um exame de fezes comum) em um momento único. O coletor será entregue ao voluntário que deverá realizar o procedimento e entregar o material logo após a coleta.

03-A coleta de fezes não envolve nenhum risco ou desconforto. As fezes serão analisadas por meio de um equipamento especial que faz a pesquisa do DNA das bactérias.

04-Não haverá benefício direto ao participante da pesquisa. Os conhecimentos que serão produzidos, entretanto, poderão beneficiar futuros estudos de caracterização de microbiota intestinal.

05 - Não há procedimentos alternativos pelos quais o paciente possa optar para participar da pesquisa.

06- Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Ester Cerdeira Sabino, que pode ser encontrada no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 – Prédio II - 1º andar – Laboratório de Parasitologia (LIM 46) – Telefone: 3061-7041. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Avenida Doutor Arnaldo, 455 – São Paulo – SP – Fone/Fax: 55+11+3061-8004 – e-mail: cep.fm@usp.br

07- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

08 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

09 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Estudo do efeito de diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes para a caracterização da microbiota intestinal, através de sequenciamento

de nova geração”

Eu discuti com a Dra. ***Ester Cerdeira Sabino*** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida R, Gerbaba T, Petrof EO. Recurrent *Clostridium difficile* infection and the microbiome. *J Gastroenterol*. 2016;51(1):1-10.
2. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 1993;31(9):2421-6.
3. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*. 2012;12(5):611-22.
4. Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(4):634-42.
5. Bahl MI, Bergström A, Licht TR. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;329(2):193-7.
6. Bezirtzoglou E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*. 1997;3(2-3):173-7.
7. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors

and centenarians. PLoS One. 2010;5(5):e10667.

8. Blekhman R, Tang K, Archie EA, Barreiro LB, Johnson ZP, Wilson ME, et al. Common methods for fecal sample storage in field studies yield consistent signatures of individual identity in microbiome sequencing data. Sci Rep. 2016;6:31519.
9. Cani PD. Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. Brief Funct Genomics. 2013;12(4):381-7.
10. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108 Suppl 1:4516-22.
11. Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, et al. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. BMC Microbiol. 2012;12:158.
12. Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Klaenhammer TR, Ringel Y. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage. PLoS One. 2012;7(10):e46953.
13. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc. 2006;1(2):581-5.
14. Choo JM, Leong LE, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. Sci Rep. 2015;5:16350.

15. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4586-91.
16. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009;326(5960):1694-7.
17. Cox LM, Blaser MJ. Pathways in microbe-induced obesity. *Cell Metab*. 2013;17(6):883-94.
18. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res*. 2012;160(4):246-57.
19. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1713-9.
20. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11971-5.
21. Dorn PL, Selgean S, Guillot M. Simplified method for preservation and polymerase chain reaction-amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92(2):253-5.

22. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(1):219-26.
23. Fouhy F, Deane J, Rea MC, O'Sullivan Ó, Ross RP, O'Callaghan G, et al. The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119355.
24. Francino MP. Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens.* 2014;3(3):769-90.
25. Fujimoto M, Moyerbrailean GA, Noman S, Gizicki JP, Ram ML, Green PA, et al. Application of ion torrent sequencing to the assessment of the effect of alkali ballast water treatment on microbial community diversity. *PLoS One.* 2014;9(9):e107534.
26. Gangarapu V, Yıldız K, Ince AT, Baysal B. Role of gut microbiota: obesity and NAFLD. *Turk J Gastroenterol.* 2014;25(2):133-40.
27. Gülden E, Wong FS, Wen L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol.* 2015;159(2):143-53.
28. Hur KY, Lee MS. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J.* 2015;39(3):198-203.
29. Jünemann S, Prior K, Szczepanowski R, Harks I, Ehmke B, Goesmann A, et al. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One.* 2012;7(8):e41606.

30. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):321-35.
31. Klymiuk I, Bambach I, Patra V, Trajanoski S, Wolf P. 16S Based Microbiome Analysis from Healthy Subjects' Skin Swabs Stored for Different Storage Periods Reveal Phylum to Genus Level Changes. *Front Microbiol*. 2016;7:2012.
32. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4578-85.
33. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1489-99.
34. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res*. 2007;14(4):169-81.
35. Lauber CL, Zhou N, Gordon JI, Knight R, Fierer N. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;307(1):80-6.
36. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-48.

37. Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, Geuking MB, Lawson MA, Wyss M, et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun.* 2015;6:8292.
38. Li K, Bihan M, Yooseph S, Methé BA. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. *PLoS One.* 2012;7(6):e32118.
39. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol.* 2012;30(5):434-9.
40. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 2012;489(7415):220-30.
41. Milani C, Hevia A, Foroni E, Duranti S, Turrone F, Lugli GA, et al. Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One.* 2013;8(7):e68739.
42. Röder B, Frühwirth K, Vogl C, Wagner M, Rossmanith P. Impact of long-term storage on stability of standard DNA for nucleic acid-based methods. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4260-2.
43. Roesch LF, Casella G, Simell O, Krischer J, Wasserfall CH, Schatz D, et al. Influence of fecal sample storage on bacterial community diversity. *Open Microbiol J.* 2009;3:40-6.
44. Roger LC, Costabile A, Holland DT, Hoyles L, McCartney AL. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology.* 2010;156(Pt 11):3329-41.

45. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348-52.
46. Salipante SJ, Kawashima T, Rosenthal C, Hoogestraat DR, Cummings LA, Sengupta DJ, et al. Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(24):7583-91.
47. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*. 2015;33(9):496-503.
48. Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56 Suppl 4:S44-9.
49. Tedjo DI, Jonkers DM, Savelkoul PH, Masclee AA, van Best N, Pierik MJ, et al. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126685.
50. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
51. Valverde JR, Mellado RP. Analysis of metagenomic data containing high biodiversity levels. *PLoS One*. 2013;8(3):e58118.
52. Vlčková K, Mrázek J, Kopečný J, Petrželková KJ. Evaluation of

- different storage methods to characterize the fecal bacterial communities of captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *J Microbiol Methods*. 2012;91(1):45-51.
53. Vogtmann E, Chen J, Amir A, Shi J, Abnet CC, Nelson H, et al. Comparison of Collection Methods for Fecal Samples in Microbiome Studies. *Am J Epidemiol*. 2017;185(2):115-23.
 54. Vogtmann E, Goedert JJ. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br J Cancer*. 2016;114(3):237-42.
 54. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(16):5261-7.
 56. Wei Y, Zhu W, Gong J, Guo D, Gu L, Li N, et al. Fecal Microbiota Transplantation Improves the Quality of Life in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2015;2015:517597.
 57. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6578-83.
 58. Wu GD, Lewis JD, Hoffmann C, Chen YY, Knight R, Bittinger K, et al. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol*. 2010;10:206.
 59. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol*.

2014;12(9):635-45.

60. Yergeau E, Lawrence JR, Sanschagrin S, Waiser MJ, Korber DR, Greer CW. Next-generation sequencing of microbial communities in the Athabasca River and its tributaries in relation to oil sands mining activities. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(21):7626-37.
61. Yoon MY, Lee K, Yoon SS. Protective role of gut commensal microbes against intestinal infections. *J Microbiol.* 2014;52(12):983-9.
62. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut.* 2008;57(11):1605-15.