UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área Análises Clínicas

**Uso da biblioteca genômica *RNAr 16S* como ferramenta
para o estudo da microbiota fecal humana**

Juliana Bannwart de Andrade Machado

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área Análises Clínicas

**Uso da biblioteca genômica *RNAr 16S* como ferramenta
para o estudo da microbiota fecal humana**

Juliana Bannwart de Andrade Machado

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves

São Paulo
2013

Juliana Bannwart de Andrade Machado

Dissertação de Mestrado

FCF/USP

2013

Juliana Bannwart de Andrade Machado

**Uso da biblioteca genômica *RNAr 16S* como ferramenta
para o estudo da microbiota fecal humana.**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____

*Aos meus pais **Joaquim** e **Julita**, que
sempre investiram em minha formação com
carinho, amor e paciência.*

*Ao **Fernando**, por todo o amor,
compreensão e incentivo e aos meus
queridos filhos **Felipe** e **Lucas**.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que, em sua infinita bondade, me capacitou para vencer mais esta etapa da realização de um sonho.

À Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves, por me orientar, apoiar, aconselhar, incentivar e acreditar na conclusão deste trabalho. Agradeço por toda a dedicação, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, incentivo, paciência e pela grande amizade que se iniciou durante este trabalho.

À Profa. Dra. Tit. Marina Baquerizo Martinez, agradeço pela oportunidade recebida, por me aceitar como aluna e dividir todo o conhecimento e competência profissional, auxiliando meu crescimento pessoal e profissional. Sou grata por toda a sua amizade, dedicação, orientação, paciência e apoio.

Ao Dr. Rubens Duarte e ao Dr. Itamar de Souza Santos por todo auxílio e colaboração dedicados à realização deste trabalho.

As amigas do grupo da “Microbiota” Fernanda, Silvia e Isabel, pelas inúmeras ajudas no laboratório e por todos os problemas compartilhados na condução dos experimentos.

Aos amigos de laboratório da FCF-USP, Fabiana, Hadassa, Lucas, Renée, Juliana Campos, Elizabeth, Renata e Carol, pela agradável convivência.

Aos amigos do SLC-HU-USP Carol (*in memoriam*), Ligia, Luciane, Iára, Marta, Silvinha, Lilian, Lisinha, Lucilene, Ana Cris, Maria Elisa, Marlene, Vanda, Daniel, Valéria, Mayara, Thiago, Denise, Marisa, Sueli, Daniela Yoshie, Cláudia, Célia, Daniela Crema, Valdir, enfim agradeço a todos os demais funcionários do SLC, pela amizade, pelo apoio e incentivo.

Ao meu querido Fernando, por todo o seu amor, paciência, incentivo e compreensão. E por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, na imensa ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Joaquim e Julita pelo apoio, incentivo e dedicação.

A meus queridos filhos Felipe e Lucas pelo todo amor e carinho.

A todos que de alguma maneira me ajudaram, incentivaram e apoiaram. **Muito Obrigada!**

RESUMO

MACHADO, J.B.A. **Uso da biblioteca genômica *RNAr 16S* como Ferramenta para o Estudo da Microbiota Fecal Humana.** 2013. 81f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo que geralmente vive em harmonia com seu hospedeiro. É essencial para o desenvolvimento e funcionamento adequado do sistema imunológico da mucosa durante o início da vida, um processo que atualmente é conhecido por ser importante para a imunidade de adultos. A microbiota intestinal compreende aproximadamente 1000 espécies, das quais 80% não são cultiváveis. Tendo em vista a importância de se conhecer a microbiota humana e a utilização da ferramenta da construção da biblioteca genômica *RNAr 16S* ser relativamente recente, esse estudo tem como objetivo analisar diferentes protocolos para avaliar o uso desta ferramenta para o estudo da microbiota intestinal humana. Para a realização dos ensaios experimentais, o DNA extraído de fezes de seis crianças, em diferentes faixas etárias, foi utilizado para a criação de um pool, o qual foi utilizado nos ensaios de PCR. As bibliotecas *RNAr 16S* foram construídas utilizando 2 pares de iniciadores bactéria-específicos 27F-1492R e 63F-1387R, variando o tempo de desnaturação inicial de cada reação de amplificação do gene *RNAr 16S* entre 5 e 10 minutos, e 1 par de iniciadores 341F-518R. Os clones foram selecionados aleatoriamente, parcialmente sequenciados e analisados com base em banco de dados do gene *RNAr 16S*. A diversidade da microbiota foi menor quando os iniciadores 63F-1387R foram utilizados, em comparação aos resultados dos iniciadores 27F-1492R, no entanto, apenas o par de iniciadores 63F-1387R identificou *Bifidobacterium* sp., gênero importante para o desenvolvimento da microbiota intestinal humana. Não houve diferenças significativas na diversidade quando o tempo de desnaturação inicial da reação de PCR foi estendido para 10 minutos. Com o uso do par de iniciadores 341F-518R mostrou uma diversidade satisfatória, uma maior riqueza, quando comparada com os outros pares de iniciadores e detectou a presença de *Bifidobacterium* sp. Os dados obtidos sugerem que mais de um par de iniciadores deve ser empregado para o estudo da microbiota fecal quando se utilizar a biblioteca de *RNAr 16S* como ferramenta.

Palavras-chave: microbiota fecal, biblioteca genômica 16S rRNA, PCR, iniciadores e diversidade

ABSTRACT

MACHADO, J.B.A. Using the genomic library 16S rRNA as a Tool to Study of Human Fecal Microbiota. 2013. 81f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The intestinal microbiota is a complex ecosystem that usually lives in harmony with its host. It is essential for the development and proper functioning of the mucosal immune system during beginning of the life, a process that is currently known to be important for overall immunity of adults. The intestinal microbiota comprises about 1000 species, 80% of which are not cultivable. Given the importance of understanding the human microbiota and that the use of the tool library construction genomic 16S rRNA is relatively recent, this study aims to analyze different protocols to evaluate the use of this tool to study of the human intestinal microbiota. To perform the experimental tests, the DNA extracted from feces of six children, in different age groups, was used for the creation of a pool, which was used in the PCR assays. The 16S rRNA libraries were constructed using 2 pairs of primers specific-bacterium 27F-1492R and 63F-1387R, varying the denaturation time of each initial amplification reaction between 5 and 10 minutes, and the pair of primers 341F - 518R. The clones were randomly selected, partially sequenced and analyzed based on database 16S rRNA gene. The diversity of the microbiota was lower when the primers 63F - 1387R were used when compared with the results of the primers 27F - 1492R. However, only the pair 63F - 1387R was able to identified *Bifidobacterium* spp., important genus for the development of the microbiota from human gut. No significant differences in diversity were observed when the time of initial denaturation of the PCR reaction was extended to 10 minutes. By using the pair of primers 341F - 518R a satisfactory diversity, with detection of *Bifidobacterium* spp., and greater richness were observed, compared with the other pairs of primer. The data suggests that more than one pair of primers should be used for the study of fecal microbiota when using the library of 16S rRNA as a tool.

Keywords: fecal microbiota, genomic library 16S rRNA, PCR, primers and diversity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gene *RNAr 16S* desenhado com base na sequência de *E. coli* (BROSIUS et al., 1981) Marcações em azul - regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco – sequência conservada no Domínio Bactéria.....23
- Figura 2.** Gene *RNAr 16S* desenhado com base na sequência de *E. coli* (BROSIUS et al., 1981) Marcações em azul - regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco – sequência conservada no Domínio Bactéria. Setas: Indicação de local de anelamento dos primers utilizados neste trabalho.....36
- Figura 3.** Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata com os iniciadores 27F-1492R, utilizando-se 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.42
- Figura 4.** Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata com os iniciadores 27F-1492R, utilizando-se 10 minutos como tempo de desnaturação inicial a 94°C.43
- Figura 5.** Abundância relativa da microbiota obtida a partir da reação de amplificação com rampa de 29,8% com os iniciadores 27F-1492R utilizando-se 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.....44
- Figura 6.** Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata, com os iniciadores 27F-1387R utilizando-se 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.46
- Figura 7.** Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata com os iniciadores 63F-1387R, utilizando-se 5 minutos como tempo de desnaturação inicial a 94°C.47
- Figura 8.** Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata com os iniciadores 63F-1387R utilizando-se 10 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.48

Figura 9. Abundância relativa da microbiota obtida a partir da amplificação com o par de iniciadores 63F-1492R, utilizando 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.....	49
Figura 10. Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata, com os iniciadores 341F-518R utilizando-se 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.	50
Figura 11. Análise de agrupamento da similaridade dos clones sequenciados entre as triplicatas de cada par de iniciadores utilizados na reação de amplificação do gene <i>RNAr 16S</i> . A1, A2 e A3 – reações da triplicata 27F-1387R; B1, B2 e B3 – reações da triplicata 27F-1492R; C2, C3 e C4 – reações da triplicata 27F-1492R “Hot Start”; E1, E2 e E3 – reações da triplicata 63F-1387R; D1, D2 e D3 – reações da triplicata 63F-1387R “Hot Start”; F1, F2 e F3 – reações da triplicata 341F-518R.....	53
Figura 12. Análise por NMDS da abundância relativa dos clones sequenciados entre as triplicatas de cada par de iniciadores utilizados na reação de amplificação do gene <i>RNAr 16S</i> . A1, A2 e A3 – reações da triplicata 27F-1387R; B1, B2 e B3 – reações da triplicata 27F-1492R; C2, C3 e C4 – reações da triplicata 27F-1492R “Hot Start”; E1, E2 e E3 – reações da triplicata 63F-1387R; D1, D2 e D3 – reações da triplicata 63F-1387R “Hot Start”; F1, F2 e F3 – reações da triplicata 341F-518R.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores universais para reação de amplificação do gene <i>RNAr</i> 16S.....	25
Tabela 2. Sequências de iniciadores utilizados na amplificação do gene <i>RNAr</i> 16S.	35
Tabela 3. Índices de riqueza (Ace e CHAO), de diversidade (Simpson e Shannon) de cobertura (GOOD), sob um cutoff de 95% (Gênero). Para os iniciadores utilizados	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
pH	Potencial Hidrogeniônico
ATP	Adenosina Trifosfato
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturante
FISH	Hibridização Fluorescente in-sito
PFGE	Eletroforese por Campo Pulsátil
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
qPCR	Reação de Polimerização em Cadeia Quantitativo
pb	Pares de bases
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
CSEB	Centro de Saúde Escola Butantan
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
NaOAC	Acetato de sódio
Rpm	Rotação por minuto
USP	Universidade de São Paulo
PhPh	Eletropherogram Quality Analysis
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
NMDS	Escala Multidimensional Não Métrica
C	Citosina
G	Guanina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	32
2.1.	Objetivo Geral	32
2.2.	Objetivos Específicos	32
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1.	Local do Estudo e Inclusão	33
3.2.	Considerações Éticas	33
3.3.	Amostras	34
3.3.1.	Material Clínico	34
3.3.2.	Extração de DNA	34
3.3.3.	Amplificação da região <i>RNAr 16S</i> pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
3.3.4.	Clonagem da Biblioteca 16S	37
3.3.6.	Análise Filogenética	38
3.3.7.	Análise Estatística	38
3.3.7.1.	Método Fisher do Programa R	38
3.3.7.2.	Ferramentas de Bioinformática	39
4.	RESULTADOS	41
4.1.	Estudo da abundância relativa nas diferentes bibliotecas genômicas construídas	41
4.1.1.	Par de Iniciadores 27F-1492R: amplificação gene <i>RNAr 16S</i>	41
4.1.2.	Par de Iniciadores 27F– 1387R: amplificação gene <i>RNAr 16S</i>	45
4.1.3.	Par de Iniciadores 63F–1387R: amplificação gene <i>RNAr 16S</i>	46
4.1.4.	Par de Iniciadores 63F–1492R: amplificação gene <i>RNAr 16S</i>	48

4.1.5. Par de Iniciadores 341F–518R: amplificação gene <i>RNAr 16S</i>	49
4.2. Análise dos índices de cobertura, riqueza e diversidade.....	51
4.3. Análise de Similaridade	52
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8. ANEXO – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA	79

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal humana faz parte de um complexo ecossistema, interagindo intimamente com os nutrientes e com as células do hospedeiro (CAICEDO et al., 2005). Os micro-organismos pertencentes à microbiota intestinal colonizam a mucosa e estabelecem comunidades relativamente estáveis com os outros micro-organismos e o hospedeiro. A colonização dos patógenos é temporária, apenas no período que causa a doença (DAVID et al., 2005). Portanto, a microbiota intestinal humana tem importante influência no desenvolvimento da imunidade inata do hospedeiro, na regulação, desenvolvimento e nutrição das células epiteliais da mucosa intestinal. Alteração na complexa composição da microbiota intestinal é um fator contribuinte na patogênese de várias doenças, tais como doença inflamatória do intestino, ou síndrome do intestino irritável (BIEDERMANN et al., 2013).

A microbiota intestinal humana é composta por uma microbiota residente chamada indígena ou autóctone, que convive harmonicamente com o hospedeiro, podendo ser patogênica quando há um desequilíbrio no ecossistema. Bactérias que apenas passam através do trato gastrointestinal provenientes do meio ambiente, mas não têm capacidade de se estabelecerem, são chamadas de alóctones. As alóctones não colonizam o intestino, somente em circunstâncias adversas (MACKIE et al., 1999).

A superfície da mucosa intestinal constitui uma vasta área coberta por uma camada de muco. Esta camada de muco apresenta várias funções, como a proteção das células epiteliais subjacentes pela ação de barreira ou zona de tampão entre as células epiteliais e o externo (DAVID et al., 2005).

A capacidade das bactérias entéricas colonizar o trato intestinal é determinada, em grande parte, pelas características dos micro-organismos, como por exemplo, a sua habilidade de adesão a superfícies da mucosa, da dinâmica combinação do trato intestinal em geral e a superfície da mucosa, particular de cada hospedeiro (DAVID et al., 2005).

A mucosa intestinal humana é a principal interface entre o sistema imunológico e o ambiente externo. A microbiota tem efeito estimulante no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro. Nos animais de experimentação isentos de bactérias, os nódulos linfáticos são menores e menos comuns. O efeito estimulante da microbiota no tecido imunológico do hospedeiro está envolvido em aspectos da resistência, que são importantes nos estágios iniciais das infecções por patógenos. No trato gastrointestinal existe um estado de modulação imunológica constante. Ao mesmo tempo em que o sistema imunológico está pronto para reagir contra bactérias patogênicas, é capaz também de se manter tolerante em relação à microbiota, sendo esta capacidade chamada de tolerância oral, que é um processo mantido ativamente (PENNA e NICOLI, 2003; SCHIFFRIN, 2000; WINKLER et al., 2007).

A superfície da mucosa intestinal está em contato contínuo com a microbiota, a qual desempenha o importante papel de exercer um efeito barreira impedindo a colonização ou invasão do hospedeiro por bactérias patogênicas, além de participar ativamente da mucosa, formando a primeira linha de defesa do intestino (SHIFFRIN e BLUM, 2002).

Uma etapa para colonização é a capacidade das bactérias aderirem à superfície da mucosa. Para colonizar permanentemente um sítio do intestino, que caracteristicamente tem uma elevada atividade peristáltica, a maioria das bactérias

precisa aderir firmemente ao epitélio da mucosa. Os componentes dos ecossistemas bacterianos competem para ocupar os receptores em diferentes sítios de adesão (FANARO et al., 2003). O epitélio intestinal é revestido por um gel de muco protetor composto predominantemente de glicoproteínas, como as mucinas, que oferecem numerosas vantagens ecológicas para as bactérias intestinais. Essas mucinas representam uma fonte direta de carboidratos, peptídeos e nutrientes exógenos, incluindo vitaminas e minerais (DEPLANCKE e GASKINS, 2001; GASKINS et al., 2008).

O processo de estabelecimento da microbiota intestinal é influenciado por fatores externos (extrínsecos) e internos (intrínsecos) ao hospedeiro. Os fatores externos estão relacionados com a carga microbiana do ambiente, hábitos alimentares, composição da microbiota materna, forma de nascimento cesária ou parto normal, stress e dieta. Os fatores internos envolvem a fisiologia do hospedeiro, nutrientes endógenos e a microbiota. Inúmeros fatores influenciam a estabilidade da microbiota, tais como pH intestinal, interações microbianas, temperatura ambiental, fatores fisiológicos, peristaltismo, ácidos biliares, resposta imune, drogas terapêuticas e receptores bacterianos da mucosa. (MACKIE et al., 1999).

O início da colonização do trato gastrointestinal ocorre logo após o nascimento. A partir deste momento, começa uma sucessão ecológica na composição da microbiota intestinal humana (FAVIER et al., 2002). Os primeiros micro-organismos que colonizam o trato gastrointestinal do recém-nascido são as bactérias provenientes da mãe e do meio ambiente. Desta forma o primeiro fator determinante na composição da microbiota intestinal é a forma de nascimento. Crianças nascidas por parto normal são colonizadas inicialmente por bactérias da microbiota vaginal materna. Crianças nascidas por parto cesáreo são colonizadas

primeiramente por bactérias presentes no ambiente hospitalar. A microbiota destas crianças se apresenta mais heterogênea em relação às de crianças nascidas por parto normal (CAMPEOTTO et al., 2007). O intestino do recém-nascido é estéril, mas logo é colonizado por micro-organismos do meio externo principalmente os presentes no canal vaginal da mãe. As bactérias começam aparecer nas fezes horas após o nascimento e seus números aumentam progressivamente durante a primeira semana de vida (OUWEHAND et al., 2002). Os primeiros micro-organismos isolados nas fezes das crianças recém-nascidas são frequentemente anaeróbios facultativos, enterobactérias, principalmente *E. coli*, *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.. A partir da primeira semana de vida, o meio do trato gastrointestinal passa a ser um meio anaeróbio estrito, propiciando o aparecimento de *Bifidobacterium* sp., *Clostridium* sp. e *Bacteroides* sp. nas fezes (OUWEHAND et al., 2002). No primeiro ano de vida, a microbiota intestinal é considerada variável e instável, pois a sua composição parte da esterilidade até a uma densa colonização. Mas é em torno dos 24 meses de vida da criança que a composição da microbiota intestinal se torna mais estável e normal ao adulto, mesmo com a interação permanente com micro-organismos do meio ambiente (SCHIFFRIN e BLUM, 2002; PALMER et al., 2007, VAEL e DESAGER, 2009).

A microbiota bacteriana intestinal tem o papel fundamental na proteção ecológica do hospedeiro dificultando o estabelecimento de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal. Este fenômeno é conhecido como “resistência à colonização”, “interferência microbiana” ou “efeito barreira” (GARRETT et al., 2010; VRIEZE et al., 2010; DAVID et al., 2005). Entre os mecanismos usados pelas bactérias descreve-se a produção de substratos que inibiriam o crescimento das bactérias patogênicas

(antagonismo), a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão (TANNOCK, 2001).

Outra função importante atribuída à microbiota intestinal está relacionada à sua contribuição para nutrição e metabolismo do hospedeiro, evidenciada pela sua capacidade de interferir no pH do intestino e na motilidade intestinal, favorecendo a absorção de íons e água e na diferenciação de células da mucosa. A microbiota ainda exerce atividade enzimática produzindo vitamina K e outras vitaminas (GUANER e MALAGELADA, 2003).

As bactérias são responsáveis pela fermentação de uma série de substratos não digeridos que chegam ao lúmen colônico, principalmente carboidratos. A maioria dos produtos ácidos resultantes desta fermentação é reabsorvida pela mucosa colônica, ocorrendo o ganho energético (PENNA e NICOLI, 2003).

As bactérias intestinais realizam atividades enzimáticas ou metabólicas, gerando produtos finais com potenciais tóxicos ou efeitos benéficos, que têm importância fisiológica ou fisiopatológica. Muito dos benefícios ou malefícios desta atividade bacteriana ainda estão em investigação (MOUNTTZOURIS et al., 2002).

Algumas bactérias, bacilos Gram-positivos, como *Bifidobacterim* sp. e *Lactobacillus* sp., representam duas principais bactérias benéficas, também chamadas de probióticos. São micro-organismos que favorecem um balanço saudável da microbiota intestinal, por produzirem compostos orgânicos decorrentes da atividade fermentativa, que inibem a multiplicação de bactérias patogênicas ao epitélio intestinal. Além disso, estas bactérias são capazes de contribuir para a redução da alergenicidade das proteínas e estimulam a produção de ácidos graxos de cadeia curta e muco, auxiliando na eficácia do papel de barreira da mucosa intestinal (Wall et al., 2008).

As bactérias intestinais são capazes de produzirem vitaminas K e as vitaminas do complexo B e os ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelos seus metabolismos, em particular o butirato, produzidos por componentes da microbiota, como *Faecalibacterium* sp., encontrado principalmente em adultos. Estas substâncias proporcionam um efeito importante na saúde do cólon, protegendo contra o câncer, colites ulcerativas e promovem o desenvolvimento normal de células do epitélio colônico. O butirato no intestino assume efeitos no controle da produção de citocinas, na produção de energia (ATP) para os colonócitos, na síntese de muco, na síntese de corpos cetônicos, na proliferação, diferenciação e maturação de células intestinais, controle da função de barreira intestinal, controle de apoptose de células normais e malignas e controle de patógenos (CANNY e MCCORMICK, 2008; GUILLOTEAU et al., 2010; JOST et al., 2012).

As bactérias que colonizam todo o trato gastrointestinal compreendem uma alta concentração de microrganismos, representando maior número e a maior diversidade de coleções bacterianas que colonizam o corpo humano. As bactérias anaeróbias são predominantes, cujo número aumenta progressivamente por todo o cólon.

O conhecimento da composição da microbiota humana, o processo de colonização e as interações com o hospedeiro estão sendo elucidados nas últimas décadas empregando técnicas independentes de cultivo (HUGENHOLTZ e TYSON, 2008). O estudo da microbiota intestinal era realizado com técnicas dependentes de cultivo, porém, apenas de 30 a 40 espécies bacterianas são cultiváveis, refletindo a dificuldade existente em se conhecer toda diversidade de micro-organismos que residem no trato gastrointestinal, além de outros sítios (TANNOCK, 2001; FURRIE, 2006; MORAIS e JACOB, 2006).

As técnicas moleculares têm revelado uma grande diversidade da microbiota nas amostras analisadas, permitindo a identificação de bactérias não cultiváveis. Em particular, a análise da sequência do gene RNA ribossomal (*RNAr*) fornece uma ferramenta imensamente poderosa para determinar a inter-relação evolucionária dos microrganismos (BLAUT et al., 2002).

Ribossomos procariotos contêm duas subunidades, denominadas 50S e 30S. A subunidade 50S contém 34 proteínas, além dos *RNAr* 5S e 23S *RNAr*. A subunidade 30S contém 21 proteínas e a molécula de *RNAr* 16S. O *RNAr* 16S tem sido a molécula mais amplamente empregada para se conhecer a filogenia dos procariotos (BLAUT et al., 2002).

O gene que codifica o *RNAr* tem regiões de consenso que estão presentes em todas as bactérias e regiões de variabilidade que são específicas de grupos e espécies particulares. Dentro destas regiões variáveis há também pequenas áreas de hipervariabilidade, que podem ser únicas para diferentes cepas de um mesmo organismo. Portanto, a sequência do gene que codifica o *RNAr* pode ser usada para identificar espécies diferentes e cepas de espécies particulares, dentro de uma comunidade bacteriana mista e complexa, usando tecnologia em série. Apenas o uso de técnicas moleculares avançadas, nas quais se podem examinar múltiplos organismos de múltiplos doadores, podem fornecer uma descrição exata da complexidade destas comunidades bacterianas (FURRIE, 2006).

Figura 1. Gene *rRNA* 16S desenhado com base na sequência de *E. coli* (BROSIUS et al., 1981) Marcações em azul - regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco – sequência conservada no Domínio Bactéria.

As análises moleculares de comunidades complexas foram primeiramente empregadas em estudos ambientais analisando de forma abrangente como os ecossistemas respondem às perturbações ambientais (Rondon, et al., 2000; BRITSCHGI e GIOVANNONI, 1991; GIL et al., 2006). Diante de resultados abrangentes e esclarecedores acerca da microbiota ambiental e da dificuldade de se conhecer a realidade das comunidades microbianas do ser humano, a metagenômica passou a ser ferramenta de estudo na análise da microbiota de mucosas humanas a partir do início dos anos 2000 (HUGENHOLTZ e TYSON, 2008).

Metagenômica é a análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo, ou seja, a análise de material genético recuperado diretamente a partir de amostras de determinada comunidade que se pretende estudar (HUGENHOLTZ e TYSON, 2008). A metagenômica proporciona uma relativa visão imparcial, não só da estrutura da comunidade (riqueza de espécies e distribuição), mas também o potencial funcional (metabólico) de uma comunidade. (HUGENHOLTZ e TYSON, 2008).

Análises filogenéticas baseadas em PCR e construção de biblioteca genômica de *rRNA* 16S têm sido utilizadas para caracterizar a microbiota de fezes humana (HAYASHI et al., 2003; HAYASHI et al., 2005). Os diferentes estudos da microbiota

intestinal utilizando o método de amplificação do gene *RNAr 16S* disponíveis na literatura mostram uma grande diversidade e variedade dos componentes bacterianos desta microbiota (LI et al., 2012; DURBAN et al., 2011; REHMAN et al., 2010; WALKER et al., 2011; SHEN et al., 2010; LIN et al., 2013).

O preparo da amostra é uma etapa importante quando se usa técnicas moleculares. A definição exata da microbiota intestinal ainda é muito difícil, uma vez que os procedimentos de coleta de tecidos são invasivos e a informação obtida a partir da análise da microbiota das fezes não fornece resultados precisos sobre a microbiota de mucosa intestinal. Porém alguns estudos demonstraram que a microbiota fecal reflete a microbiota do cólon intestinal (TANNOCK, 2005). As amostras colhidas por biópsias do cólon intestinal não estão livres de contaminação, pois o fluído fecal continua presente na superfície do intestino. Portanto, não está claro o que exatamente está sendo descrito nos estudos atuais, se é a composição de mucosa ou a contaminação da comunidade fecal (TANNOCK, 2005).

Atualmente, há vários “Kits” comerciais que são utilizados para fazer a extração e purificação de DNA diretamente das fezes frescas e congeladas. Um dos primeiros passos destes protocolos é a lise das células contidas nas amostras de fezes através de um tampão de lise e posterior incubação. Como as bactérias são diferentes, havendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, classificadas de acordo com a composição química e com a estrutura da parede bacteriana, podendo ser mais ou menos susceptíveis a lise. Organismos Gram-positivos são particularmente resistentes. Portanto, a extração de DNA deve ser otimizada para construção de uma biblioteca efetiva (FURRIE, 2006).

Para a amplificação do gene *RNAr 16S* são utilizados iniciadores considerados universais, uma vez que eles anelam regiões conservadas. Alguns dos

principais iniciadores universais descritos na literatura estão relacionados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Iniciadores universais para reação de amplificação do gene *RNAr 16S*

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Grupo Alvo	Referência
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Universal	TURNER et al. 1999
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Universal	LANE et al. 1991
63F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	Universal	MARCHESI et al. 1998
CC [F]	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGC	Universal	RUDI et al. 1997
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	Universal	TURNER et al. 1999
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Universal	MUYZER et al. 1993
357F	CTCCTACGGGAGGCAGCAG	Universal	TURNER et al. 1999
533F	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	Universal	WEISBURG et al. 1991
1237F	GGGCTACACACGYGCWAC	Universal	TURNER et al. 1999
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Universal	MUYZER et al. 1993
519R	GWATTACCGCGGCKGCTG	Universal	LANE et al. 1985
CD [R]	CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC	Universal	RUDI et al. 1997
907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	Universal	LANE et al. 1985
1387R	GGGCGGWGTGTACAAGGC	Universal	MARCHESI et al. 1998
1392R	ACGGGCGGTGTGTRC	Universal	LANE et al. 1985
1492R	ACCTTGTTACGACTT	Universal	LANE et al. 1991

Apesar de serem considerados iniciadores universais, os dados descritos na literatura indicam o uso destes iniciadores em comunidades específicas, como por exemplo, o iniciador universal 8F tem sido utilizado para avaliar a microbiota vaginal

humana (COOLEN et al., 2005), além da microbiota intestinal humana (LIN et al., 2013; DURBÁN et al., 2011; SHEN et al., 2010; CARROLL et al., 2012).

Para avaliar a microbiota ambiental, podem ser utilizados os iniciadores universais CCF e CDR (RUDI et al., 1997), os iniciadores 519R, 907R e 1392R (LANE et al., 1985) e os iniciadores 8F, 357F, 515F, 1237F, 519R e 907R (TURNER et al., 1999).

Os trabalhos mostrando a microbiota intestinal de seres humanos revelam a utilização do iniciador 27F (LANE, et al., 1991; HAYASHI et al., 2002; HAYASHI et al., 2005, LI et al., 2012; REHMAN et al., 2010; WALKER et al., 2011; MAI et al., 2013; TOTTEY et al., 2013). No estudo da análise molecular da microbiota fecal de idosos descrito por HAYASHI e colaboradores (2003), os autores empregaram a metodologia da construção da biblioteca *RNAr 16S* utilizando os iniciadores universais 27F e o 1492R e foram identificadas as principais bactérias pertencentes aos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, além de alguns clones não cultiváveis. Nestes estudos da microbiota humana, notamos a ausência ou a baixa frequência de identificação de bactérias importantes na microbiota humana, como por exemplo, *Bifidobacterium* sp. (HAYASHI et al., 2002; HAYASHI et al., 2005).

MARCHESI e colaboradores (1998), descreveram um novo par de iniciadores para a amplificação do gene *RNAr 16S* de amostras ambientais e humanas, denominados 63F e 1387R. Neste estudo, as principais espécies representativas do domínio *Bacteria* foram identificadas a partir deste gene, porém, cepas de *Bifidobacterium* sp. não foram detectadas por este protocolo. Em nosso laboratório, contudo, estudos preliminares mostraram que este par de iniciadores foi capaz de amplificar o gene 16S de clones de *Bifidobacterium* sp. a partir de fezes de uma criança com sete dias de vida.

Em outro estudo para evidenciar a microbiota intestinal de ratos, foi utilizado o par de iniciadores 341F e 518R, como demonstrado por MONTESI et al. (2005).

A construção da biblioteca genômica *RNAr 16S* tem sido amplamente utilizada para caracterizar a microbiota intestinal humana ao longo das últimas duas décadas, mesmo sendo uma metodologia de custo significativo e de intenso trabalho (HAYASHI et al., 2005; STRAUSBERG et al., 2008; LI et al.; 2012; LIN et al., 2013; DURBÁN, et al., 2011; REHMAN et al., 2010; WALKER et al., 2011; SHEN et al., 2010). Embora a construção da biblioteca de *RNAr 16S* possa resultar numa avaliação menos sensível da diversidade bacteriana, revela diferenças significativas entre os membros da microbiota intestinal e permite a caracterização dos organismos mais abundantes, que podem ser melhor adaptadas para o seu nicho (ZOETENDAL et al., 2004; Li et al., 2010; RICUCCI e SIQUEIRA, 2010).

Além de biblioteca genômica, outras técnicas moleculares são utilizadas na determinação de microrganismos da microbiota, cuja determinação por cultura ou identificação bioquímica é difícil, por exemplo, DGGE (eletroforese em gel por desnaturação de gradiente), hibridização *in situ* (FISH), ribotipagem, eletroforese por campo pulsátil (PFGE) e PCR em tempo real (FURRIE, 2006; MATSUKI et al., 2002; MOUNTZOURIS et al., 2002).

A técnica de DGGE, quando combinada com sequenciamento de clones de *RNAr 16S*, permite a determinação da taxonomia dos membros de uma comunidade microbiana (FAVIER et al., 2002). A metodologia de DGGE é baseada na separação dos produtos de PCR por desnaturação da dupla fita dos fragmentos em gel de poliacrilamida contendo gradiente de ureia e formamida. A separação por eletroforese em gel de agarose convencional resulta em uma única banda não descritiva. Com a técnica de DGGE têm-se a separação dos produtos de PCR de

acordo com as diferenças nas sequências do fragmento, permitindo a distinção de duas moléculas de DNA bacteriano que possuam apenas uma base diferente (MUYZER, et al.,1998)

O método de FISH (Hibridização Florescente *In-Situ*) é baseado na reação em cadeia (PCR) e utiliza sondas de oligonucleotídeos ligadas a um componente fluorescente que hibridiza regiões específicas do *RNAr* 16S, podendo ser evidenciadas pela fluorescência. A enumeração desses micro-organismos fluorescentes pode ser feita microscopicamente pela contagem visual ou por análise de imagem (LEVSKY e SINGE, 2003).

Alguns autores utilizam a metodologia de PCR em tempo real (qPCR), com iniciadores específicos, para a detecção de gêneros específicos de bactérias (PENDERS et al., 2006). Esta técnica tem se mostrado mais sensível que o PCR clássico, inclusive por seu limite de detecção de células bacterianas por grama de amostra fecal ser mais baixo que a técnica convencional (MATHYS et al.,2008).

Outras ferramentas metagenômicas utilizadas são as tecnologias de sequenciamento de nova geração, promovendo o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (plataforma 454 FLX da Roche; Solexa da Illumina, Solid system da Applied Biosystems). Estas novas plataformas consistem na amplificação *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, permitindo que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez.

A tecnologia do sequenciamento Sanger baseia-se na eletroforese capilar e detecção fluorescente de coloração múltipla para cada base nitrogenada, método dideoxi enzimático, que consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxiribonucleotídeos, que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em

replicação pela DNA polimerase após sua adição. Atualmente os sequenciadores que empregam química Sanger tem capacidade de gerar, pelo menos 1 a 2 milhões de pares de bases (pb) por um período de 24 horas, com leituras maiores de 800 pb de comprimento e com precisão muito elevada (STRAUSBERG et al., 2008)

A plataforma 454 FLX da Roche – sequenciamento baseado em síntese, o pirosequenciamento, a leitura da sequência nesse sistema é realizada pela combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida esse pirofosfato é convertido para ATP, pela ATP sulfúrilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal capturado por uma câmara acoplada ao sistema. O 454 FLX tem capacidade de gerar 200 milhões de bp por dia, com leituras de 250 pb de comprimento (CARVALHO e SILVA, 2010 ; STRAUSBERG et al., 2008).

O uso de métodos moleculares traz vantagens na identificação da população intestinal, pois são técnicas de alta especificidade, com alto rendimento, realizadas em um tempo mais curto que a maior parte das metodologias convencionais e quando combinadas as técnicas, além de identificarem as bactérias, inclusive as espécies não cultiváveis, é possível quantificá-las. A identificação das bactérias anaeróbias é facilitada comparada com a técnica de cultivo, não exigindo tratamento e experiência do microbiologista. As amostras podem ser congeladas para posterior análise e o DNA extraído pode ser facilmente transportado (FURRIE, 2006).

Apesar das vantagens apresentadas, as técnicas moleculares podem ser caras e difíceis de padronizar. Dependem da extração adequada do material genético e nem sempre os métodos apresentam uma boa sensibilidade. A seleção dos iniciadores pode introduzir um viés importante na detecção. Os dados das

sequências têm aumentado a uma taxa maior do que poder computacional disponibilizado atualmente e ainda há a necessidade de comparações para melhor interpretar os metagenomas, que aumentam os requisitos computacionais de forma exponencial (FURRIE, 2006; HUGENHOLTZ e TYSON, 2008).

Um estudo conduzido em nosso laboratório, da microbiota fecal de 10 crianças até 1 ano de idade avaliadas neste trabalho, por biblioteca genômica *RNAr* 16S utilizando o par de iniciador 27F- 1492R na reação de amplificação do gene *RNAr* no tempo de desnaturação de 5 minutos, os resultados mostraram que não ocorre a detecção de microrganismos dos gêneros *Bifidobacterium* e *Eubacterium*, e o gênero *Lactobacillus* foi detectado em baixas porcentagens. Interessantemente, as bactérias anaeróbias dos gêneros *Bacteroides* e *Clostridium* foram detectadas com frequência. (BRANT et al., 2012; TADDEI et al., 2013). A progressão da abundância relativa dos gêneros bacterianos encontrados do segundo dia ao décimo segundo mês de vida destas 10 crianças, demonstraram que ao passar dos meses a diversidade aumentou e existiu uma tendência a estabilidade da microbiota intestinal no primeiro ano de vida (Taddei et al., 2013).

Em outro estudo do grupo, utilizando a metodologia de DGGE com o par de iniciador 341F-518R, este mesmo panorama correlacionando a diversidade de cada criança ao longo do primeiro ano de vida, confirmou a tendência de estabilidade da microbiota intestinal no mesmo período de 1 ano.

Utilizando experimentos em PCR em tempo real para detectar e quantificar as bactérias anaeróbias como *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Lactococcus* sp., nosso grupo observou que, de fato, estas bactérias estão presentes e em abundância.

Tendo em vista os resultados dos trabalhos citados acima, a dificuldade da biblioteca genômica do gene *RNAr 16S* com a reação de amplificação utilizando o par de iniciador 27F-1492R detectar grandes quantidades de bactérias Gram positivas e a impossibilidade de encontrar o gênero *Bifidobacterium*, o objetivo deste estudo foi analisar diferentes protocolos de reação para avaliar o uso da biblioteca do gene *RNAr 16S* como ferramenta para o estudo da microbiota intestinal humana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o uso da biblioteca genômica *RNAr 16S* como ferramenta para o estudo da microbiota fecal humana.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a riqueza e diversidade obtida na construção da biblioteca do gene *RNAr 16S*:

- Utilizando diferentes pares de iniciadores
- Variando o tempo da temperatura de desnaturação da reação de amplificação do gene *RNAr 16S*.
- Variando a rampa do termociclador para otimizar as temperaturas dos ciclos da reação de amplificação do gene *RNAr 16S*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do Estudo e Inclusão

O estudo foi realizado em amostras de fezes de bebês nascidos no Hospital Universitário (HU) da USP, que posteriormente foram acompanhados por 12 meses no Centro de Saúde Escola Butantan (CSEB).

As crianças foram selecionadas de mães saudáveis que realizaram pré-natal no HU-USP, nascidas a termo por parto vaginal, com peso adequado na faixa de 2500g a 4000g, sem nenhuma enfermidade aparente e índice de Apgar ≥ 8 .

As análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

3.2. Considerações Éticas

O presente estudo utilizou amostras de fezes obtidas anteriormente no HU-USP, como descrito em Brandt et al. (2012). A coleta das fezes foi iniciada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HU (anexo). As mães foram informadas através de linguagem clara sobre os objetivos da pesquisa, os métodos de investigação empregados e da necessidade de acompanhamento periódico de suas crianças. Após esclarecimento verbal realizado pela pesquisadora executante da pesquisa e o consentimento da mãe foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

Toda necessidade da criança durante o período do estudo, no que se refere ao uso de drogas e eventuais mudanças dietéticas foram respeitadas, sendo este um estudo de observação e não de intervenção.

3.3. Amostras

Com objetivo de selecionar uma amostragem com riqueza e diversidade relevantes, seis amostras de fezes de crianças em diferentes faixas etárias foram utilizadas para a obtenção de um pool de DNA.

3.3.1. Material Clínico

As amostras de fezes foram obtidas da fralda do bebê pós-evacuação e mantidas a seco sob refrigeração até o momento da entrega no CSEB.

As fezes foram transportadas refrigeradas até o Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, estas amostras foram fracionadas em alíquotas de 200mg em microtubos e imediatamente armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise.

3.3.2. Extração de DNA

A obtenção do DNA do material fecal foi realizada segundo HAYASHI e colaboradores (2003), utilizando o kit para isolamento de DNA genômico, bacteriano de amostras de fezes QIAmp DNA Stool Mini (Quiagem) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de DNA extraído das fezes foi feita no

NanoDrop (Thermo Scientific) e a qualidade do material genético avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA extraído foi mantido à temperatura de -20°C até o momento de uso. Após a extração e quantificação, 400ng de DNA de cada uma das seis amostras selecionadas para o estudo foram unificadas em um pool de DNA, o qual, então, foi utilizado como molde nas reações de amplificação.

3.3.3. Amplificação da região *RNAr 16S* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

O pool de DNA foi utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase para amplificação da região *RNAr 16S*, utilizando os iniciadores universais para organismos procariotos do domínio bactéria proposto por HAYASHI e colaboradores (2005), MARCHESI e colaboradores (1998) e MUYZER e colaboradores (1993). As sequências dos oligonucleotídeos apresentam-se listados na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências de iniciadores utilizados na amplificação do gene *RNAr 16S*.

Iniciador	Sequência	Referência
27F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	HAYASHI et al., 2005
1492R	5' GGTTACCTTGTACGACTT 3'	HAYASHI et al., 2005
63F	5'CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'	MARCHESI et al., 1998
1387R	5'GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'	MARCHESI et al., 1998
341F	5'CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	MUYZER et al.,1993
518R	5'ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	MUYZER et al., 1993

Figura 2. Gene *rRNA* 16S desenhado com base na sequência de *E. coli* (BROSIUS et al., 1981) Marcações em azul - regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco – sequência conservada no Domínio Bactéria. Setas: Indicação de local de anelamento dos primers utilizados neste trabalho.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 100 µL contendo 180 ng de DNA extraído das amostras fecais, 2 mM de MgSO₄, 0,2 mM de DNTP, 0,5 µM de cada iniciador e 1 un Platinum DNA Taq Polimerase (Invitrogen). As condições de reação foram as mesmas propostas pelos autores acima citados, porém, sofreram modificações quanto ao tempo de desnaturação, variando-se o tempo de “Hot Start” inicial, visando uma maior acessibilidade ao DNA das bactérias Gram-positivas. Desta forma, foram adotados dois tempos de desnaturação inicial, a saber: 5 (“Hot Start 1”) e 10 min (“Hot Start 2”), a 94°C, seguido o ciclo de amplificação de 1 min a 94°C, 50 segundos a 57°C e 1 min e 30 segundos a 68°C em 30 ciclos e seguido de 5 min a 68°C. Os amplicons 16S foram purificados utilizando Kit GE HealthCare, marca Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (made in UK), de acordo com o fabricante, quantificados no NanoDrop (Thermo Scientific) e estocados a –20°C até o momento do uso.

3.3.4. Clonagem da Biblioteca 16S

Após a amplificação do gene *RNAr 16S*, o amplicon purificado de cada amplificação foi ligado em um plasmídeo vetor pCR[®]2.1 TOPO. Bactérias competentes *E.coli* DH5 α foram transformadas com este vetor utilizando-se o Kit Original TA Cloning (Invitrogen). A biblioteca genômica foi obtida com os clones selecionados de cada amplificação e estes foram cultivados em meio LB caldo com kanamicina (50 μ g/ml) por 18 hs. Em seguida, 1 μ L do caldo foi lisado em água MilliQ sob fervura a 20 min, e utilizado como DNA molde em reação de amplificação com iniciadores M13. Os amplicons obtidos a partir desta reação foram purificados com Kit GE HealthCare marca Illustra[™] GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (made in UK), o DNA quantificado na concentração mínima de 10 ng/ μ L. Cada DNA foi utilizado para a reação de sequenciamento.

3.3.5. Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume final de 15 μ L contendo 10 a 40 ng de DNA de cada clone obtido da clonagem de *RNAr 16S*, H₂O, BigDye, tampão 5X e oligoiniciador T7 na concentração de 0,8 pmol/ μ L, conforme orientações do fabricante (Applied Biosystems). As condições de reação foram: 1 min a 96°C, seguido o ciclo de amplificação de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C em 35 ciclos e todas as etapas foi inserido a rampa 1°C/s.

Após finalização das reações, foi realizada a precipitação utilizando glicogênio a 1mg/mL. Esta precipitação consiste em adicionar a reação uma solução de etanol absoluto gelado, NaOAc a 3M com pH 5,2 e glicogênio, homogeneizar e manter em

gelo por 15 minutos e centrifugar a 4000 rpm por 20 minutos. Posteriormente, o DNA foi lavado com 50 µL de etanol 70% gelado e mantido a seco a - 20°C.

Para a geração de uma sequência consenso, o DNA obtido foi encaminhado para o sequenciamento do Instituto de Química da USP, com a utilização da técnica de Sanger.

3.3.6. Análise Filogenética

As sequências do gene *RNAr 16S* geradas por sequenciamento foram examinadas pela ferramenta Phred, disponível *online* no *software* Eletropherogram Quality Analysis (PhPh) da EMBRAPA, para a verificação de qualidade dos eletroferogramas obtidos. As sequências qualificadas com score maior que 20 foram editadas manualmente no *software* BioEdit v7.0.5.3 (HALL, 1999) para remover as sequências do vetor e do iniciador, e então comparadas com sequências *RNAr 16S* existentes no banco de genes GenBank do NCBI (PEARSON and LIPMAN, 1988). As sequências com mais de 97% de similaridade foram designadas como sendo do mesmo gênero.

3.3.7. Análise Estatística

3.3.7.1. Método Fisher do Programa R

Para avaliar a reprodutibilidade da abundância relativa das reações de cada par de iniciador e também para comparar os resultados obtidos foi utilizado o teste exato de Fisher do programa R (CORE TEAM, 2012).

3.3.7.2. Ferramentas de Bioinformática

Para a análise dos resultados das bibliotecas *RNAr 16S* geradas por sequenciamento, as sequências foram submetidas a um pré-tratamento. Duas abordagens foram utilizadas neste estudo, método baseado em OTU (Unidade Taxonômica Operacional) e teste de hipótese.

As sequências tratadas como descrito no item 3.3.6. foram divididas em dois grupos “Forward” e “Reverse” e renomeadas, somente as sequências no sentido de leitura 5´3´ foram analisadas.

Os artefatos quiméricos foram analisados pelo Chimera Slayer no *software* Mothur v1.26.0 e os mesmos foram excluídos das análises subsequentes. O Mothur também foi utilizado para realizar o alinhamento das sequências, a construção da matriz de distância, o agrupamento das OTUs, os cálculos dos índices de diversidade e os testes de hipóteses (SCHLOSS et al., 2009).

As sequências das bibliotecas foram alinhadas contra o banco de dados Silva versão 102 (QUAST et al., 2013), que contém cerca de 370.000 sequências de bactérias e *Archaea* pré-alinhadas; depois de alinhadas, foram removidos os *gaps* comuns das sequências.

O método baseado em OTU permite analisar os índices de riqueza e a diversidade de uma comunidade bacteriana por uma matriz de distância.

A análise da diversidade calculada pelos índices de Simpson e Shannon se refere à variedade e à complexidade de espécies de uma comunidade. Os índices de diversidade de Simpson, Shannon foram calculados para cada biblioteca. Para os cálculos dos índices foram utilizados como limites de corte os valores de 75%, para

o nível taxonômico de filo; 85%, para classe; 95%, para gênero; e 97%, para espécie (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994).

A análise de riqueza compartilhada de Ace e Chao1 avalia a abundância numérica baseada no número de OTU de uma comunidade. Entre os pontos de análise foram calculados os índices de riqueza compartilhada, baseando-se no número de OTU.

A análise de cobertura, também chamado “Cobertura de Good”, avalia a representatividade do conjunto de resultados obtidos em um estudo, e o quanto estes dados reproduzem a comunidade observada. A cobertura mínima de 90% representa que os índices de diversidade calculados alcancem algo mais próximo a realidade (GOOD, 1953; LEMOS et al, 2011).

A análise de NMDS é um escalonamento multidimensional não métrico que visualiza o nível de similaridade de casos individuais de um conjunto de dados. Refere-se a um conjunto de técnicas coordenadas para exibir a informação contida numa matriz de distâncias. Um algoritmo NMDS visa colocar cada objeto no espaço n-dimensional de tal modo que as distâncias entre os objetos são preservados o quanto for possível.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da abundância relativa nas diferentes bibliotecas genômicas construídas.

Os experimentos para a construção da biblioteca genômica com o pool de DNA foram realizados para cada par de iniciadores, 27F-1492R (HAYASHI et al., 2005), e 63F-1387R (MARCHESI et al., 1998), 341F-518R (MUYZER et al., 2005), 27F-1387R e 63F-1492R com o objetivo de avaliar diferenças de diversidade e riqueza em diferentes tempos de desnaturação. Aproximadamente, 100 clones de cada clonagem, foram analisados para garantir uma amostragem significativa da diversidade obtida.

4.1.1. Par de Iniciadores 27F-1492R: amplificação gene *RNAr 16S*

Com o par de iniciadores 27F-1492R, no tempo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, os resultados de abundância relativa mostraram o predomínio dos gêneros *Clostridium* e *Escherichia* e de bactérias não cultiváveis (**Figura 3**). Interessantemente, a proporção entre eles não se manteve na triplicata uma vez que na reação 1 houve predomínio de *Clostridium* sp. (41%), seguido de bactérias não cultiváveis (34%) e *Escherichia* sp. (22%) e na reação 2 houve também o predomínio de *Clostridium* sp. (49%), seguido de *Escherichia* sp. (26%) e bactérias não cultiváveis (22%). Na reação 3, houve uma distribuição homogênea de *Escherichia* sp. (44%) e bactérias não cultiváveis (43%), onde a abundância relativa de *Clostridium* sp. diminuiu significativamente (11%). Foi encontrado em pequena

quantidade *Streptococcus* sp. (1%), *Proteus* sp. (1%) e *Veillonella* sp. (1%) na reação 1, *Proteus* sp. (1%) e *Enterococcus* sp. (2%) na reação 2 e *Proteus* sp. (2%) na reação 3. Observou-se que os resultados das proporções de cada micro-organismo encontrados nas três reações mostraram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Figura 3. Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata com os iniciadores 27F-1492R, utilizando-se 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C ("Hot Start 1").

Com o par de iniciadores 27F-1492R, no tempo de desnaturação inicial de 10 minutos a 94°C, a abundância relativa obtida mostrou um predomínio de *Escherichia* sp., bactérias não cultiváveis e *Clostridium* sp. (**Figura 4**). Quando utilizou este tempo de desnaturação, na reação 1 notou-se uma distribuição homogênea na abundância relativa de *Clostridium* sp. (38%) e *Escherichia* sp. (35%), seguido das bactérias não cultiváveis (24%) e na reação 2 houve uma distribuição homogênea na abundância relativa de bactérias não cultiváveis (38%) e *Escherichia* sp. (32%), seguido *Clostridium* sp. (28%). Na reação 3 houve um predomínio de *Escherichia* sp. (46%), seguido de bactérias não cultiváveis (32%) e *Clostridium* sp. (21%). Foram encontrados em pequenas quantidades os gêneros *Enterococcus* (2%), *Veillonella*

(1%) na reação 1, *Enterococcus* sp. (1%) e *Streptococcus* sp. (1%) na reação 2 e o gênero *Streptococcus* (1%) na reação 3. Estatisticamente o perfil da abundância relativa encontrada nas três reações mostrou diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 4. Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata com os iniciadores 27F-1492R, utilizando-se 10 minutos como tempo de desnaturação inicial a 94°C (“Hot Start 2”).

Comparando-se a soma dos resultados da abundância relativa encontrados nas três reações para cada tempo de desnaturação inicial, quando estes iniciadores foram utilizados, não mostraram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$), observando que a soma da abundância relativa dos micro-organismos e a riqueza dos gêneros encontrados são semelhantes nos dois tempos de desnaturação, independentemente da abordagem utilizada, ou seja, aumentando o tempo de “Hot Start” não alterou a quantidade relativa de micro-organismos com este par de iniciadores.

Numa tentativa de aumentar a riqueza, foi utilizado também, o par de iniciadores 27F-1492R com a rampa de 29,8%, onde 100% é a rampa máxima do equipamento Veriti da Applied Biosystems, que corresponde a 3,9°C/segundos

ocorridas nas alterações das temperaturas durante a reação de amplificação, portanto 1,16°C/segundos na reação de amplificação do gene *RNAr 16S*. Este aumento no tempo para atingir cada temperatura, durante a reação de amplificação, teve como objetivo otimizar as temperaturas dos ciclos da reação de amplificação, mas a abundância relativa encontrada foi semelhante nos resultados encontrados *Escherichia* sp. (32%), bactérias não cultiváveis (37%), *Clostridium* sp. (30%) e o aparecimento de uma pequena quantidade de *Akkermansia* sp. (1%) (**Figura 5**).

Figura 5. Abundância relativa da microbiota obtida a partir da reação de amplificação com rampa de 29,8% com os iniciadores 27F-1492R utilizando-se 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.

Não foi possível visualizar o aumento da riqueza, alterando a rampa da reação para 29,8%, pois observou a ausência dos gêneros como *Proteus*, *Enterococcus*, *Veionella* e *Streptococcus* encontrados anteriormente, utilizando este mesmo par de iniciadores.

4.1.2. Par de Iniciadores 27F– 1387R: amplificação gene *RNAr 16S*

Na tentativa de evidenciar uma maior riqueza, foi utilizado o par de iniciadores 27F-1387R, e os resultados de abundância relativa mostraram o predomínio de bactérias não cultiváveis e dos gêneros *Clostridium* e *Escherichia* (**Figura 6**). Observou que a proporção entre eles não se manteve nas três reações, onde na reação 1 houve predomínio de bactérias não cultiváveis (54%), seguido de *Clostridium* sp. (33%) e *Escherichia* sp. (8%) e na reação 2 também houve um predomínio de bactérias não cultiváveis (56%), seguido de *Clostridium* sp. (20%) e *Escherichia* sp. (20%). Na reação 3, como nas outras reações houve o predomínio de bactérias não cultiváveis (44%), seguido *Clostridium* sp. (35%) e *Escherichia* sp. (20%). Foram encontrados em pequenas quantidades os gêneros *Proteus* (1%), *Veillonella* (1%), e *Streptococcus* (3%), na reação 1, os gêneros *Veillonella* (3%), e *Enterococcus* (1%), na reação 2 e o gênero *Proteus* (1%), na reação 3. Estatisticamente o perfil da abundância relativa encontrado nas três reações mostrou diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 6. Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata, com os iniciadores 27F-1387R utilizando-se 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.

No momento do uso do par de iniciadores 27F-1387R a riqueza obtida foi semelhante a encontrada quando utilizado o par de iniciadores 27F-1492R, mas a soma dos resultados da abundância relativa dos micro-organismos encontrados nas três reações, quando foi utilizado o par de iniciadores 27F–1387R mostraram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), comparados com a soma dos resultados da abundância relativa encontradas nas três reações do par de iniciadores 27F-1492R.

4.1.3. Par de Iniciadores 63F–1387R: amplificação gene *RNAr 16S*

Com o par de iniciadores 63F-1387R, no tempo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, os resultados da abundância relativa foi predominantemente compostos pelo gênero *Escherichia*, seguido de bactérias não cultiváveis, dos gêneros *Clostridium*, *Bifidobacterium* e *Proteus* (**Figura 7**). Interessantemente, a proporção entre eles se manteve nas três reações com predomínio de *Escherichia sp.* (81%, 84% e 76%), seguido de bactérias não cultiváveis (7%, 10% e 11%) e

Clostridium sp. (7%, 3% e 9%). Com este par de iniciadores observou-se a detecção do gênero *Bifidobacterium* nas três reações, porém em baixa abundância (5%, 1% e 4%) quando comparado aos outros gêneros encontrados. Não houve diferença estatisticamente significativa nas quantidades relativas dos micro-organismos encontrados nas três reações ($p>0,05$).

Figura 7. Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata com os iniciadores 63F-1387R, utilizando-se 5 minutos como tempo de desnaturação inicial a 94°C ("Hot Start 1").

Com o par de iniciadores 63F-1387R, no tempo de desnaturação inicial de 10 minutos a 94°C, a abundância relativa também foi predominantemente composta pelo gênero *Escherichia*, seguido de bactérias não cultiváveis, *Bifidobacterium* sp. e *Clostridium* sp. (**Figura 8**). Quando utilizou este tempo de desnaturação, na reação 1 notou-se um predomínio da abundância relativa de *Escherichia* sp. (66%), seguido de *Bifidobacterium* sp. (16%), *Clostridium* sp. (11%) e bactérias não cultiváveis (7%) e na reação 2 houve também um predomínio *Escherichia* sp. (76%), seguido de bactérias não cultiváveis (16%), *Clostridium* sp. (5%) e *Bifidobacterium* sp. (3%). Na reação 3, como nas outras duas reações houve um predomínio de *Escherichia* sp. (58%), seguido de *Clostridium* sp. (24%), bactérias não cultiváveis (12%) e

Bifidobacterium sp. (6%). Estatisticamente o perfil da abundância relativa encontrada nas três reações mostrou diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 8. Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata com os iniciadores 63F-1387R utilizando-se 10 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C ("Hot Start 2").

Comparando a soma dos resultados encontrados nas duas triplicatas nos dois tempos de desnaturação inicial utilizados, observa-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre elas, com aumento da abundância relativa do gênero *Bifidobacterium* e a diminuição da riqueza dos gêneros encontrados em 10 minutos de desnaturação inicial.

4.1.4. Par de Iniciadores 63F–1492R: amplificação gene *RNAr 16S*.

Foi utilizado também o par de iniciadores 63F-1492R a abundância relativa foi predominantemente composta pelo gênero *Escherichia* (75%) (**Figura 9**). Este predomínio foi seguido de bactérias não cultiváveis (19%) e *Clostridium* sp. (6%).

Figura 9. Abundância relativa da microbiota obtida a partir da amplificação com o par de iniciadores 63F-1492R, utilizando 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.

Com o par de iniciadores 63F-1492R foram detectados apenas os micro-organismos representados por *Escherichia sp.*, bactérias não cultiváveis e *Clostridium sp.*, mostrando uma diminuição significativa na riqueza anteriormente encontrada pelos outros pares de iniciadores utilizados.

4.1.5. Par de Iniciadores 341F–518R: amplificação gene *RNAr 16S*

Com o par de iniciadores 341F-518R a abundância relativa foi predominantemente composta pelo gênero *Escherichia* (**Figura 10**), porém a distribuição da abundância não foi homogênea nas duas primeiras reações, uma vez que a reação 1 apresentou predomínio de *Escherichia sp.* (58%), seguido de bactérias não cultiváveis (28%), *Bifidobacterium sp.* (10%), *Clostridium sp.* (3%) e *Streptococcus sp.* (1%) e na reação 2 também houve predomínio de *Escherichia sp.* (47%), seguido de bactérias não cultiváveis (23%), *Clostridium sp.* (23%) e pequenas quantidades de *Bifidobacterium sp.* (4%) e *Bacteroides sp.* (3%). Na reação 3 houve uma distribuição homogênea de *Escherichia sp.* (30%), bactérias não cultiváveis (26%), *Bifidobacterium sp.* (23%), *Clostridium sp.* (19%) e uma

pequena quantidade de *Lactobacillus* sp. (1%) e *Veillonella* sp. (1%). O perfil da abundância relativa de cada micro-organismo encontrado nas três reações mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Notou-se o aparecimento dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacteroides*, que ainda não tinham sido detectados pelos pares de iniciadores utilizados anteriormente.

Figura 10. Abundância relativa da microbiota obtida a partir das amplificações em triplicata, com os iniciadores 341F-518R utilizando-se 5 minutos como tempo inicial de desnaturação a 94°C.

Comparando-se o par de iniciadores 341F-518R com os pares 27F-1492R e 63F-1387R observou-se uma diversidade satisfatória e melhor riqueza nos resultados da abundância relativa obtidos. É importante destacar que nas três reações o gênero *Bifidobacterium* foi detectado.

4.2. Análise dos índices de cobertura, riqueza e diversidade

A análise de cobertura foi realizada para verificar se as quantidades de sequências e triplicatas utilizadas no estudo em questão foram significativas para as conclusões realizadas.

Pela análise realizada, os índices de cobertura foram superiores a 94% para um cutoff de 95% (gênero), mostrando que o número de clones sequenciados foi suficiente para a conclusão dos resultados em todas as reações realizadas. Isto indica que o esforço amostral foi suficiente para representar a diversidade da comunidade observada, em cada par de iniciador e em todas suas reações, não sendo necessário o aumento do número de clones analisados (**Tabela 3**).

Quanto ao índice de riqueza das reações realizadas, que indica o número de gêneros esperado para cada par de iniciadores utilizados (Chao1), pode-se verificar que 84% das reações obtiveram valores de Chao1 semelhantes aos números de OTUs encontrados nas análises para cada par de iniciadores (**Tabela 3**), mostrando que os resultados encontrados foram representativos.

O índice de diversidade Simpson, que tem amplitude de 0 a 1, indica que valores mais próximos de 0 tem uma maior relação entre o número de gêneros encontrados e sua abundância relativa. Pode-se constatar, pelas médias obtidas deste índice nas reações, que os pares de iniciadores 27F-1492R “Hot Start 1” ($\bar{x}=0,356$), 27F-1492R “Hot Start 2” ($\bar{x}=0,361$) e 341F-518R ($\bar{x}=0,381$) tiveram uma maior diversidade, quando comparadas com 27F-1387R ($\bar{x}=0,534$), 63F-1387R “Hot Start 1” ($\bar{x}=0,648$) e 63F-1387R “Hot Start 2” ($\bar{x}=0,546$). Em relação ao índice de Shannon, que indica que quanto maior o índice, maior a diversidade, observa-se também, pelas médias deste índice das reações, que os pares de iniciadores 27F-

1492R “Hot Start 1” ($\bar{x}$ =1,153), 27F-1492R “Hot Start 2” ($\bar{x}$ =1,107) e 341F-518R ($\bar{x}$ =1,228) tiveram uma maior diversidade, quando comparadas com 27F-1387R ($\bar{x}$ =0,871), 63F-1387R “Hot Start 1” ($\bar{x}$ =0,690) e 63F-1387R “Hot Start 2” ($\bar{x}$ =0,834) (Tabela 3).

Tabela 3. Índices de riqueza (Ace e CHAO), de diversidade (Simpson e Shannon) de cobertura (GOOD), sob um cutoff de 95% (Gênero). Para os iniciadores utilizados.

Iniciadores	Reação	Número de Sequencias	OTUs	Riqueza		Diversidade				Cobertura
				Ace	Chao1	Simpson		Shannon		(%)
						*V	**M	*V	**M	
27F-1387R	1	70	5	8,5	6,0	0,592		0,806		97%
27F-1387R	2	61	6	8,0	6,3	0,449	0,534	1,022	0,871	97%
27F-1387R	3	58	4	5,1	4,0	0,563		0,783		98%
27F-1492R "Hot Start 1"	1	43	5	13,9	6,0	0,364		1,154		95%
27F-1492R "Hot Start 1"	2	69	7	0,0	13,0	0,306	0,356	1,304	1,153	94%
27F-1492R "Hot Start 1"	3	89	4	5,9	4,0	0,398		1,003		99%
27F-1492R "Hot Start 2"	1	53	3	3,0	3,0	0,394		0,979		100%
27F-1492R "Hot Start 2"	2	61	4	5,9	4,0	0,372	0,361	1,066	1,107	98%
27F-1492R "Hot Start 2"	3	77	7	0,0	13,0	0,316		1,276		95%
63F-1387R "Hot Start 1"	1	58	4	4,5	4,0	0,747		0,536		98%
63F-1387R "Hot Start 1"	2	84	7	17,4	8,0	0,682	0,648	0,722	0,690	96%
63F-1387R "Hot Start 1"	3	47	3	3,0	3,0	0,515		0,811		100%
63F-1387R "Hot Start 2"	1	62	4	5,8	4,0	0,518		0,873		98%
63F-1387R "Hot Start 2"	2	79	5	8,7	6,0	0,576	0,546	0,785	0,834	97%
63F-1387R "Hot Start 2"	3	55	5	8,0	5,5	0,544		0,842		96%
341F-518R	1	67	6	9,4	6,5	0,465		1,060		97%
341F-518R	2	87	10	35,4	15,0	0,390	0,381	1,318	1,228	94%
341F-518R	3	52	5	6,1	5,0	0,288		1,307		98%

* = Valor do Índice; ** = Média aritmética.

4.3. Análise de Similaridade

A análise de agrupamento avaliou a similaridade dos resultados obtidos com os diferentes pares de iniciadores utilizados. Observou-se o agrupamento das

amostras em dois grandes grupos separados por 56% de similaridade entre eles (grupos I e II). O grupo I foi formado pelas sequências obtidas pelos iniciadores 27F-1387R, 27F-1492R “Hot Start 1” e 27F-1492R “Hot Start 2”, mostrando uma similaridade de 73% (**Figura 11**). O grupo II foi constituído pelas sequências obtidas quando se utilizou os pares de iniciadores 63F-1387R “Hot Start 1”, 63F-1387R “Hot Start 2” e 341F-518R com similaridade de 75% (**Figura 11**).

Figura 11. Análise de agrupamento da similaridade dos clones sequenciados entre as triplicatas de cada par de iniciadores utilizados na reação de amplificação do gene *RNAr* 16S. A1, A2 e A3 – reações da triplicata 27F-1387R; B1, B2 e B3 – reações da triplicata 27F-1492R “Hot Start 1”; C2, C3 e C4 – reações da triplicata 27F-1492R “Hot Start 2”; E1, E2 e E3 – reações da triplicata 63F-1387R “Hot Start 1”; D1, D2 e D3 – reações da triplicata 63F-1387R “Hot Start 2”; F1, F2 e F3 – reações da triplicata 341F-518R.

A similaridade das sequências obtidas pelos diferentes pares de iniciadores foi avaliada também pela distância observada entre os pontos na análise de NMDS. Nesta análise, quanto mais próximos os pontos, maior a similaridade entre eles e, quanto mais distante, maior a diferença entre eles. Os resultados da análise de NMDS corroboraram com os resultados obtidos pela análise de agrupamento uma vez que se observa a presença de dois grandes grupos separados pelo eixo da abscissa (**Figura 12**), formado pelos mesmos pares de iniciadores reportados anteriormente. O grupo I apresenta aglomerado do lado esquerdo do gráfico e é constituído por gêneros bacterianos obtidos dos pares de iniciadores 27F–1387R, 27F–1492R “Hot Start 1” e 27F–1492R “Hot Start 2”. O grupo II está do lado direito do gráfico, formado pelos gêneros bacterianos obtidos dos pares de iniciadores 63F–1387R “Hot Start 1”, 63F–1387R “Hot Start 2” e 341F–518R. Isto mostra que a escolha dos iniciadores mudou a diversidade observada. Além disso, o gráfico evidencia que as diferenças entre as triplicatas são tão grandes, quanto às diferenças entre os resultados encontrados dos pares de iniciadores entre si. Nas reações 1, 2 e 3 dos iniciadores 27F–1387R a diferença entre elas não é maior do que a visualizada entre a reação 1 do par de iniciadores 27F-1387R, a reação 1 do par de iniciador 27F–1492R “Hot Start 1” e a reação 1 do par de iniciadores 27F–1492R “Hot Start 2”. Isto reforça o fato que o “Hot Start” não influencia no resultado, e a troca do iniciador 1492R pelo 1387R também não. Porém, as abundâncias relativas foram significativamente diferentes quando trocamos o iniciador 27F pelo 63F.

Figura 12. Análise por NMDS da abundância relativa dos clones sequenciados entre as triplicatas de cada par de iniciadores utilizados na reação de amplificação do gene *RNAr* 16S. A1, A2 e A3 – reações da triplicata 27F-1387R; B1, B2 e B3 – reações da triplicata 27F-1492R “Hot Start 1”; C2, C3 e C4 – reações da triplicata 27F-1492R “Hot Start 2”; E1, E2 e E3 – reações da triplicata 63F-1387R “Hot Start 1”; D1, D2 e D3 – reações da triplicata 63F-1387R “Hot Start 2”; F1, F2 e F3 – reações da triplicata 341F-518R.

5. DISCUSSÃO

Para compreender e explorar o impacto da microbiota intestinal na saúde humana e no bem estar do indivíduo é necessário conhecer o conteúdo, a diversidade e o funcionamento desta comunidade microbiana intestinal entre indivíduos saudáveis (QIN et al., 2010).

Análises filogenéticas baseadas em PCR e construção de biblioteca genômica de *RNAr 16S* são utilizadas para caracterizar a microbiota de fezes humana (HAYASHI et al., 2003; HAYASHI et al., 2005; WALKER et al., 2011; LIN et al., 2013). Com advento da biologia molecular, a construção da biblioteca do gene *RNAr 16S* revelou diferenças significativas entre os membros da microbiota intestinal de indivíduos adultos saudáveis, diferenças estas que podem contribuir para variações na fisiologia normal dos indivíduos ou até na predisposição à doenças. Estudos em seres humanos revelaram relações entre a microbiota intestinal e sua influência na maturação no sistema imunológico, na modulação da resposta à injúria da célula epitelial, no balanço energético, no suporte ao processo de biotransformação, como no processamento dos xenobióticos (GILL et al., 2006).

Estudos recentes indicam que a microbiota intestinal humana compreende aproximadamente mais de 1000 espécies, das quais 80% não são cultiváveis. A população de bactérias é muito densa no cólon, onde residem 10^{13} e 10^{14} bactérias (JONES e MARCHESI, 2007). A ferramenta da metagenômica oferece relativamente uma visão imparcial não só da estrutura da comunidade tanto como a riqueza e distribuição das espécies, além do potencial metabólico funcional de uma comunidade (HUGENHOLTZ e TYSON, 2008). A premissa básica da abordagem metagenômica é tratar o genoma coletivo de uma comunidade microbiana como um

único genoma, ou metagenoma. As estratégias são baseadas na extração de DNA da microbiota intestinal, seguido pela construção da biblioteca genômica *RNAr 16S* e subsequente sequenciamento com um alto rendimento (JONES e MARCHESI, 2007).

Os diferentes estudos da microbiota intestinal utilizando o método de amplificação do gene *RNAr 16S* disponíveis na literatura mostram uma grande diversidade e variedade dos componentes bacterianos desta microbiota. Estes estudos utilizam iniciadores chamados “universais” uma vez que anelam em regiões filogenéticas extremamente conservadas do gene *RNAr 16S* (SIPOS et al., 2007), caracterizando a reação de amplificação como PCR multialvo com produto heterogêneo. Porém, os aspectos quantitativos deste tipo de reação ainda não estão esclarecidos.

Para revelar a diversidade de composição de uma amostra procariótica até o momento desconhecida, a opção mais utilizada atualmente é o gene que codifica a menor subunidade ribossomal (16/18 *RNAr 16S*). No entanto, desenhar um perfeito par de iniciadores é impossível. Em relação às sequências do gene *RNAr 16S*, as regiões completamente conservadas compreende mais de 10% de toda a sequência, porém o maior segmento de corrida é de 10 oligonucleotídeos de comprimento. Além disso, estas posições de nucleotídeos completamente conservadas não são geralmente complementares umas as outras, e na maioria dos casos, estas extensões contêm três bases de nucleotídeos a menos de comprimento, tornando-se impossível desenhar um iniciador de comprimento suficiente que corresponda a todas as sequências bacterianas em 100%. Os iniciadores universais foram originalmente desenhados conforme informações do banco de dados disponíveis no momento da “invenção”, e raramente são atualizados

para uma nova sequência de *RNAr 16S* (SIPOS et al., 2010). Isto explica a grande variedade dos iniciadores chamados “universais” descritos na literatura.

Para maior eficiência da reação de PCR é necessário avaliar a qualidade e concentração de DNA molde, sendo a concentração máxima sugerida de 1ng/μL. É importante para um alto rendimento do produto do PCR, a escolha apropriada dos iniciadores “universais” para o estudo da comunidade microbiana de um determinado ambiente que se pretende conhecer, definindo um tamanho ideal de iniciadores (18-28 oligonucleotídeos), a temperatura de anelamento (diferença de 5°C no máximo de ambas as direções do par de iniciadores), a quantidade de citosina(C) e guanina(G) (40-60%), a ligação específica no final dos iniciadores (posição 3') e a presença e quantidade de sítios incompatíveis dos iniciadores. Para o estudo da microbiota, a escolha da enzima termoestável “DNA polimerase” é fundamental para a reação de PCR, uma vez que a função de leitura e correção da reação proporciona sequências mais fidedignas para análise (SIPOS et al., 2010).

Um dos iniciadores mais utilizados no estudo do gene *RNAr 16S* é o 27F que abrange as posições 8 até a posição 27 do gene *rRNA* de *Escherichia coli* e o 1492R abrange as posições 1492 a 1507 deste mesmo gene, as quais amplificam aproximadamente toda a extensão do gene. Estudo recente baseado nos efeitos de incompatibilidade de iniciadores, temperaturas de anelamento e número de ciclos em reações de amplificação compararam os principais iniciadores utilizados nesta metodologia e mostraram que o iniciador 27F não apresenta efeitos na variação de temperatura e nem incompatibilidades de anelamento (SIPOS et al., 2007). Contudo, outros estudos mostram que há incompatibilidade de anelamento em pelo menos três regiões do gene com relação ao gênero *Bifidobacterium*. Além disso, o DNA deste gênero bacteriano possui grandes porcentagens de C+G, o que leva a maiores

dificuldades na desnaturação e no pareamento dos iniciadores na reação de PCR, falhando, desta forma, a amplificação do gene *16S* de bifidobactérias (MATSUKI et al., 2004; SIPOS et al., 2007; MATHYS et al., 2008).

Além do 27F-1492R, o par de iniciadores 63F-1387R (MARCHESI et al., 1998) também é uma opção de escolha no estudo do gene *RNAr 16S*, apesar de apresentar algum viés contra certos grupo bacterianos, este iniciador apresenta uma melhor atuação na reação de amplificação de PCR de culturas e amostras ambientais comparadas com os outros iniciadores “universais” (SIPOS et al., 2010).

No estudo da análise molecular da microbiota fecal de idosos de HAYASHI e colaboradores (2003), os autores empregaram a metodologia da construção da biblioteca do gene *RNAr 16S*, utilizando os iniciadores universais 27F e o 1492R. Neste estudo foram identificadas as principais bactérias pertencentes aos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, além de alguns clones não cultiváveis. Neste estudo, porém, os autores não encontraram clones pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, importante grupo bacteriano da microbiota intestinal humana. A metodologia de amplificação do gene *RNAr 16S* pode não ser eficiente para amplificação deste gene em cepas de *Bifidobacterium* sp.. Contudo, outros estudos utilizando estes iniciadores na análise da microbiota intestinal puderam detectar alguns clones de *Bifidobacterium* sp. (HAYASHI et al., 2005; HAYASHI et al., 2002).

Quando utilizamos o par de iniciadores 27F - 1492R, encontramos os seguintes gêneros bacterianos, *Clostridium*, *Escherichia*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Veillonella* e *Enterococcus*, além de bactérias não cultiváveis.

Com o aumento da temperatura de desnaturação inicial na reação de PCR, esperávamos a detecção de gêneros bacterianos Gram-positivos com mais abundância, principalmente do gênero *Bifidobacterium*. Porém, isso não foi

observado nos resultados obtidos. Os clones obtidos a partir da amplificação com os iniciadores 27F - 1492R não mostraram a detecção deste gênero, porém alguns gêneros Gram-positivos, como *Streptococcus* e *Enterococcus* foram observados nos dois tempos de desnaturação inicial, mostrando que não houve restrição destes iniciadores a amostras Gram-positivas e o aumento do tempo de desnaturação inicial não alterou os resultados obtidos.

Possivelmente, com a utilização do par de iniciadores 27F-1492R as regiões de incompatibilidade de anelamento estão impedindo a detecção de *Bifidobacterium* sp., mesmo com o aumento do tempo de exposição do DNA a temperaturas de desnaturação.

Recentemente, foram propostas algumas alterações na sequência do iniciador 27F com a introdução de bases degeneradas. Essas mudanças permitiram maior afinidade no pareamento com o gene *RNAr 16S* de bactérias pertencentes a determinadas ordens, entre elas a ordem *Bifidobacteriales* (FRANK et al., 2008). Neste estudo as análises de 27F revelaram que as suas variações foram representativas nos achados de novos grupos filogenéticos, que normalmente não são encontrados pelo primer 27F, além da *Bifidobacteriales*, *Actinobacteria*, algumas *Proteobacteria*, *Chlamydiales*, *Atopobium*, *Campylobacterales*, *Sphingomonadales* e *Planctomycetales*.

No estudo da análise molecular da microbiota ambiental de MARCHESI e colaboradores (1998), os autores utilizaram o par de iniciadores 63F - 1387R e identificaram os seguintes gêneros: *Chlamydia*, *Synechocystis*, *Nostod*, *Anabaena*, *Runella*, *Prevotella*, *Cytophaga*, *Rhodobacter*, *Alcaligenes*, *Myxococcus*, *Desulfobacter*, *Wolinella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Eubacterium*, *Pseudoramibacter*,

Ruminococcus, *Veillonella*, *Micrococcus*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leptospira* e *Treponema*.

No entanto, em nosso laboratório em estudo preliminar, utilizando o iniciador 63F detectamos o gênero *Bifidobacterium*. Desta forma, estudamos a diversidade obtida na construção da biblioteca genômica da microbiota fecal com esse par de iniciadores.

Quando utilizamos o par de iniciadores 63F-1387R “Hot Start 1” foi possível identificar *Escherichia* sp., *Clostridium* sp., *Bifidobacterium* sp., *Proteus* sp. e também bactérias não cultiváveis. Com o 63F - 1387R “Hot Start 2” também foi detectado *Escherichia* sp., *Clostridium* sp., *Bifidobacterium* sp. e bactérias não cultiváveis, não sendo possível a identificação do gênero *Proteus*.

A diversidade da microbiota foi menor quando os iniciadores 63F-1387R foram utilizados quando comparada aos resultados dos iniciadores 27F-1492R. Com a utilização destes últimos, foram encontrados os gêneros *Clostridium*, *Escherichia*, *Proteus* sp, *Veillonella* sp, *Streptococcus* sp e *Enterococcus* sp, além de aproximadamente 30% de bactérias não cultiváveis. Contudo, quando foi utilizado o par de iniciadores 63F-1387R os gêneros *Veillonella*, *Streptococcus* e *Enterococcus* não foram encontrados, mas o gênero *Bifidobacterium* foi detectado e apresentou maior abundância no maior tempo de desnaturação inicial.

Esses achados mostraram que, a abundância relativa dos resultados entre as triplicatas e entre os diferentes pares de iniciadores, assim como a diversidade encontrada nos resultados não foram reprodutivas, apresentando diferentes resultados para cada novo par de iniciador empregado, ou cada triplicata. A única exceção para esta afirmação foi observada nos resultados com os pares de

iniciadores 63F–1387R, onde os resultados das três reações não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

No estudo da análise molecular da microbiota cecal de ratos de MONTESI e colaboradores (2005), os autores utilizaram o par de iniciadores 341F-518R e foram identificadas as principais bactérias pertencentes aos grupos *Lactobacillus* sp., *Clostridium* sp., *Bifidobacterium* sp., *Bacteroides* sp. e coliformes. Esse par de iniciadores tem sido largamente utilizado no estudo da microbiota intestinal pelo método de DGGE (WALL et al., 2008; ERCOLINI, 2004).

Utilizamos o par de iniciadores 341F-518R descrito por MUYZER e colaboradores (1993). Porém, esse par de iniciadores amplifica uma sequência de 180 pb referente à região V3 do gene *RNAr 16S*, e quando alinhamos esses resultados com o banco de dados de genoma bacteriano, apenas uma pequena porção do gene *RNAr 16S* é pareada, podendo comprometer a fidelidade do pareamento. Desta forma, não se preconiza o uso de sequências pequenas na construção de biblioteca genômica.

Contudo, optamos por realizar esta biblioteca a fim de avaliar a diversidade da amostra de pool de DNA e de fato, uma excelente diversidade foi encontrada, destacando-se a detecção do gênero *Bifidobacterium* com abundância relativa na triplicata (10% na reação 1, 4% na reação 2 e 23% na reação 3).

Para tentar maior eficiência de anelamento durante a reação de amplificação, alteramos a rampa do termociclador e utilizamos o par de iniciadores 27F-1492R, uma vez que os resultados preliminares mostraram que esse par de iniciador apresentou melhor diversidade.

No momento que alteramos a rampa para 29,8% na reação de amplificação do *RNAr 16S* com o par de iniciadores 27F–1492R, a fim de se verificar o aumento

da eficiência de anelamento dos mesmos, notou-se uma diminuição da riqueza, com detecção apenas dos gêneros, *Escherichia* sp., *Clostridium* sp. e do grupo de bactérias não cultiváveis, mostrando que o problema de riqueza não foi resolvido como esperado com esta abordagem.

Uma vez que o experimento da rampa não mostrou resultados satisfatórios, não dispúnhamos de tempo nem recursos financeiros para tentar a triplicata deste experimento. Desta forma, optamos por formar novos pares de iniciadores, na tentativa de manter uma boa diversidade além de conseguir amplificar gêneros ricos em C+G como *Bifidobacterium*. Quando utilizamos o par de iniciadores 27F-1387R, foi possível detectar uma riqueza semelhante quando comparada com o par de iniciadores 27F-1492R. No momento que utilizamos a formação do par de iniciadores 63F-1492R, apenas identificamos os gêneros *Clostridium* e *Escherichia* e as bactérias não cultiváveis, esta inversão não apresentou nenhum aumento na riqueza anteriormente observada pelo par de iniciadores 63F-1387R, e desta forma, pelas mesmas razões descritas acima, não completamos as triplicatas.

Os índices de riqueza e diversidade foram estimados apenas com os resultados das triplicatas dos pares de iniciadores, excluindo-se nesta análise os resultados realizados apenas em unicatas (27F-1492R com variação de rampa do termociclador e 63F-1492R).

As estimativas dos índices de riqueza mostraram que os resultados foram representativos, com base nas OTUs encontrados na maioria das reações dos iniciadores testados. Além disso, as taxas de cobertura indicaram que o esforço amostral foi suficiente para representar a diversidade da comunidade observada em cada par de iniciador e suas triplicatas, não sendo necessário o aumento de sequências analisadas.

O par de iniciadores 27F-1492R nos dois tempos de desnaturação inicial apresentou melhores índices de diversidade comparados com todos os outros iniciadores utilizados. Porém, a maior riqueza foi observada no par de iniciadores 341F-518R.

Os índices de similaridade (agrupamento e NMDS) encontrados refletem as diferenças entre os resultados descritos anteriormente das abundâncias relativas dos diferentes pares de iniciadores utilizados. Assim como foi observada uma riqueza diferente entre os resultados dos iniciadores 27F e 63F, os índices de similaridade mostraram a distribuição dos resultados em dois grupos, o grupo I representado pelos pares de iniciadores que utilizaram o 27F e o grupo II formado pelos pares de iniciadores que utilizavam o 63F.

No primeiro grupo, a triplicata dos pares de iniciadores 27F-1492R nos dois tempos de desnaturação inicial, e a triplicata dos pares de iniciadores 27F-1387R mostraram uma similaridade de 73% entre si. Além disso, observou-se uma heterogeneidade entre as reações da triplicata de um mesmo par de iniciador, onde as reações de 27F-1492R mostraram uma diferença entre elas em 10%, e do par de iniciadores 27F-1387R mostraram uma diferença de quase 20% entre elas. Os resultados da triplicata do par de iniciadores 27F-1492R em 10 minutos de desnaturação inicial foram mais homogêneos, mostrando uma maior similaridade entre as reações (83%).

O segundo grupo apresentou uma maior similaridade entre as triplicatas quando comparado com o grupo anterior. Os resultados das reações da triplicata do par de iniciadores 63R-1387R possuíram similaridade em torno de 80%, mostrando resultados semelhantes aos encontrados nas abundâncias relativas que não foram estatisticamente diferentes. Com o aumento do tempo de desnaturação inicial,

observou-se um aumento do índice de similaridade. Destacou-se aqui a diminuição da diversidade deste par de iniciador quando avaliada a abundância relativa.

O par de iniciadores 341F-518R mostrou resultados das triplicatas com similaridade de 75% entre si e foram estatisticamente diferentes entre si. Porém, neste grupo, este foi o par de iniciadores que mostrou maior riqueza.

Os resultados indicam que o par e iniciadores 27F-1492R continua sendo o de escolha para o estudo da microbiota intestinal, porém, ainda há falhas na detecção de bactérias Gram-positivas, uma vez que estas bactérias possuem em seu DNA grande quantidade de citosina(C) e guanina(G).

Novas análises precisam ainda ser conduzidas na tentativa de melhorar a eficiência deste par de iniciadores. SIPOS e colaboradores (2010) destacam a possibilidade de variação na temperatura de anelamento na reação de PCR, com consequente melhora na detecção de gêneros bacterianos, além da possibilidade de uso de mais de um par de iniciadores considerados universais.

Conclui-se então, com os resultados aqui obtidos que, para uma real amostragem da microbiota fecal utilizando a metodologia de construção de biblioteca genômica do gene *RNAr 16S*, é necessário o uso de mais de um par de iniciadores. Neste trabalho destaca-se, além do 27F-1492R, o par 341F-518R.

Nos últimos anos, o uso dos métodos de sequenciamento de alto rendimento (“high throughput”) está reescrevendo o estudo de comunidades microbianas, a custos reduzidos, melhora de eficiência e acurácia (CARDENAS e TIEDJE, 2008). As bibliotecas genômicas são analisadas com alto número de leituras, os resultados são extremamente rápidos e dispensa as etapas de clonagem e amplificação manual dos clones (STRAUSBERG et al., 2008). O DNA obtido com o pool de amostras descritos neste trabalho foi enviado para sequenciamento por metodologia

de pirosequenciamento em 454 utilizando o primer 27F (ANDREOTTI et al., 2011) e estamos aguardando os resultados, a fim de compará-los com os obtidos até o momento. Esperamos verificar as abundâncias e a diversidade neste pool de DNA, utilizando o mesmo iniciador aqui discutido, porém com uma metodologia mais robusta, e comparar com os dados aqui obtidos.

Com esses resultados, poderemos inferir se as razões dos erros de pareamento discutidos aqui ocorrem em razão dos iniciadores utilizados ou da metodologia de construção da biblioteca genômica.

6. CONCLUSÕES FINAIS

- O par de iniciadores 27F e 1492R apresentou uma maior diversidade quando comparado com o par de iniciador 63F e 1387R e esta diversidade não foi alterada quando diferentes tempos de desnaturação foram utilizados.
- O par de iniciadores 63F e 1387R apresentou uma menor diversidade em relação aos iniciadores 27F e 1492R, porém foi possível a detecção do gênero *Bifidobacterium* e com maior abundância no maior tempo de desnaturação.
- O par de iniciadores 341F e 518R apresentou uma diversidade relevante e maior riqueza quando comparado com os outros pares de iniciadores testados, com a detecção do gênero *Bifidobacterium*, com abundâncias relativas significativas.
- A variação na rampa de termociclagem mostrou diminuição significativa de diversidade e riqueza.
- Os dados obtidos sugerem que o par de iniciadores 27F-1492R parece ser o mais indicado, entre os estudados, para avaliar a diversidade das amostras fecais.
- Os dados obtidos sugerem que mais de um par de iniciadores deve ser empregado para o estudo da microbiota fecal quando se utilizar a biblioteca de *RNAr 16S* como ferramenta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOTTI, R.; LEÓN, A.A.P.; DOWD, S. E.; GUERRERO F.D.; BENDELE, K. G.; SCOLES, G. A. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology*, v.11, p. 6-17, 2011.

BIEDERMANN, L.; ZEITZ, J.; MWINYI, J.; SUTTER-MINDER, E.; REHMAN, A.; OTT, S.J.; STEURER-STEY, C.; FREI, A.; FREI, P.; SCHARL, M.; LOESSNER, M.J.; VAVRICKA, S.R.; FRIED, M.; SCHREIBER, S.; SCHUPPLER, M.; ROGLER, G. Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *Plos One*, v.8, n.3, p. 1-8, 2013.

BLAUT, M.; COLLINS, M.D.; WELLING, G.W.; DORÉ, J.; VAN LOO, J.; DE VOS, W. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal of Nutrition*, v.87, Suppl. 2, p.S203-S211, 2002.

BRANT, K.; TADDEI, C.R.; TAKAGI, E.H.; OLIVEIRA, F.F.; DUARTE R.T.D.; IRINO I.; MARTINEZ, M.B.; CARNEIRO-SAMPAIO M. Establishment of bacterial faeces community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clinics*, v.67, n.2, p.113-123, 2012.

BRITSCHGI, T.B.; GIOVANNONI, S.J. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing . *Applied And Environmental Microbiology*, v. 57, n.6, p. 1707-1713, 1991.

BROSIUS, J.; DULL, T.J.; SLEETER, D.D.; NOLLER, H.F. Gene organization and primary structure of a ribosomal rna operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, v. 148, p. 107-127, 1981.

CAICEDO, R.A.; SCHANLER, R.J.; LI, N.; NEU, J. The developing intestinal ecosystem: implications for the neonate. *Pediatr Res*, v.58, n.4, p.625-8, 2005.

CAMPEOTTO, F.; WALIGORA-DUPRIET, A. J.; DOUCET-POPULAIRE, F.; KALACH N.; DUPONT, C., BUTEL, M. J. Establishment of the intestinal microflora in neonates. *Gastroenterol Clin Biol.*, v.31(5), p.533-42, 2007.

CANNY, G.O.; MCCORMICK, B.A. Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infection and Immunity*, p.3360-3373, 2008.

CARDENAS, E.; TIEDJE, J.M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol.*, v.19, n.6, p.544-9, 2008.

CARROLL, I.M.; RINGEL-KULKA, T.; SIDDLE, J.P.; KLAENHAMMER, T.R.; RINGEL, Y. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage. *PLoS One*, v.7, n.10, p. 1-7, 2012.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, v.40, n.3, p.735-744, 2010.

COOLEN, M.J.L.; POST, E.; DAVIS, C.C.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial communities found in the human vagina by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 71, n.12, p. 8729-8737, 2005.

CORE TEAM (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

DAVID, C.L.; PAUL, S.C.; TYRRELL; C. Role of the mucus layer in bacterial colonization of the intestine. In: *Colonization of Mucosal Surfaces*. Washington, D.C.: ASM Press, 2005. cap.15, p. 199-212.

DEPLANCKE B.; GASKINS, H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr.*, Suppl. 73, p. 1131S-41S, 2001.

DURBAN, A.; ABELLAN, J.J.; JIMENEZ-HERNANDEZ, N.; PONCE, M.; PONCE, J.; SALA, T.; D'AURIA, G.; LATORRE, A.; MOYA, A. Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa. *Microb Ecol.*, v.61, p.123-133, 2011.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods*, v. 56, n.3, p. 297-314, 2004.

FANARO, S.; CHIERICI, R.; GUERRINI, P.; VIGI, V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl*, v.441, p.48-55, 2003.

FAVIER, C. F.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M.; AKKEMANS, A. D. L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in humans neonates. *Applied and Enviomental Microbiology*, p. 219-226, 2002.

FRANK, J.A.; REICH C.I.; SHARMA S.; WEISBAUM, J.S.; WILSON, B.A.; OLSEN, G. Critical Evaluation of Two Iniciadores Commonly Used for Amplification of Bacterial RNAr 16S Genes. *Appl Envir Microbiol.*, p. 2461–2470, 2008.

FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*, v.55, n.2, p.141-143, 2006.

GARRETT, W.S.; GORDON, J.I.; GLIMCHER, L.H. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell*, v.140, n.6, p.859–870, 2010.

GASKINS, H.R.; CROIX, J.A.; NAKAMURA, N.; NAVA, G.M. Impact of the intestinal microbiota on the development of mucosal defense. *Clinical Infectious Diseases*, v.46, p.S80-6, 2008.

GILL, S.R.; POP, M.; DEBOY, R.T.; ECKBURG P.B.; TURNBAUGH, P.J.; SAMUEL, B.S.; GORDON, J.I.; RELMAN, D.A.; LIGGETT, C.M.F.; NELSON, E.N. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, v.312, p.1355-1359, 2006.

GOOD, I.J. The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika*, v.40, p. 237–264, 1953.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.361, p.512-19, 2003.

GUILLOTEAU, P.; MARTIN, L.; ECKHAUT, V.; DUCATELLE, R.; ZABIELSKI, R.; VAN IMMERSEEL, F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, p.1-19, 2010.

HALL, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, v.41, p. 95-98, 1999.

HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA M.; BENNO Y. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S r DNA library and T-RFLP. *Microbiol. Immunol*, v.47(8), p.557-570, 2003.

HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA, M.; BENNO, Y. Phylogenetic analysis of human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol. Immunol.*, v.46, n.8, p.535-548, 2002.

HAYASHI, H.; TAKAHASHI, R.; NISHI, T.; SAKAMOTO, M.; BENNO Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*, v.54, p.1093 – 1101, 2005.

HUGENHOLTZ, P. ; TYSON, G.W. Metagenomics. *Nature*, v.455, p. 481-483, 2008.

JONES, B.V., MARCHESI, J.R. Accessing the mobile metagenome of the human gut microbiota. *Mol. BioSyst.*, v.3, p. 749-758, 2007.

JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.P.; CHASSARD, C. New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. *PlosOne*, v.7, n.8, p.4495, 2012.

LANE, D.J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.82, n.20, p. 6955-9, 1985

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (ed.), Chichester, United Kingdom, 1991.

LEMONS, L.N.; FULTHORPE, R.R.; TRIPLETT, E.W.; ROESCH, L.F. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *J Microbiol Methods*. v. 86, p. 42-51, 2011.

LEVSKY J.M; SINGER R.H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci*., v. 116, p. 2833-8. 2003.

LI, E.; HAMM C.M.; GULATI, A.S.; SARTOR, R.B.; CHEN, H.; WU, X.; ZHANG,T.; ROHLF, F.J.; ZHU, W.; GU, C.; ROBERTSON, C.E.; PACE, N.R.; BOEDEKER, E.C.; HARPAZ, N.; YUAN, J.; WEINSTOCK, G.M.; SODERGREN, E.; FRANK, D.N. Inflammatory bowel diseases phenotype, *C. difficile* and NOD2 genotype are associated with shifts in human ileum associated microbial composition. *PLoS One*., v. 7, n.6, p.1-10, 2012.

Li, L.; Hsiao, W.W.; Nandakumar, R.; Barbuto, S.M.; Mongodin, E.F.; Paster, B.J.; Fraser-Liggett, C.M.; Fouad, A.F. Analyzing endodontic infections by deep association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*., v.36, p.1277–1288, 2010.

LIN, A.; BIK, E.M.; COSTELLO, E.K.; DETHLEFSEN, L.; HAQUE, R.; RELMAN, D.A.; SINGH, U. Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States. *PLoS One*, v.8, n.1, p. 1-19, 2013.

MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*, v.69, p.1035S-45S, 1999.

MAI, V.; TORRAZZA, R.M.; UKHANOVA, M.; WANG, X.; SUN, Y.; LI, N.; SHUSTER, J.; SHARMA, R.; HUDAK, M.L.; NEU, J. Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PLoS One*, v.8, n.1, p. 1-9, 2013.

MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM S.J.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, v.64, n.2, p. 795-799, 1998.

MATHYS, S.; LACROIX, C.; MINI, R.; MEILE, L. PCR and real-time PCR primers developed and identification of *Bifidobacterium thermophilum* in faeces. *BMC Microbiology*, v.8, p.179, 2008.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; MIYAMOTO, Y.; TAKADA, T.; MATSUMOTO, K.; OYAIZU, H.; TANAKA, R. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied an Environmental Microbiology*, p. 5445-5451, 2002.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; KADO, Y.; TAKADA, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, p.167-173, 2004.

MONTESI, A.; ALBIACH, R.G.; POZUELO, M.J.; PINTADO, C.; GOÑI, I.; ROTGER, R. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of food microbiology*, v.98, p. 281-289, 2005.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de Pediatria*, v.82, n.5, p.189-197, 2006.

MOUNTTZOURIS, K.C.; MCCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr*, v.87, p.405-20, 2002.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, p.127-141, 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E.D.; UITIERLINDEN, A.G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied And Environmental Microbiology*, v.59, n.3, 1993.

OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur J Nutr*, v.41, Suppl 1, p.I/32-I/37, 2002.

PALMER, C.; BIK, E.M.; DIGIULIO, D.B.; RELMAN, D.A.; BROWN, P.O. – Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biology*, v.5, n.7, e.177. p.1556-1573, 2007.

PEARSON, W.R.; LIPMAN, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.85, p. 2444-2448, 1988.

PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DEN BRANDT, P.A.; STOBBERINGH, E.E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, v.118, n.2, p.511-521, 2006.

PENNA, F.J.; NICOLI J.R. Microbiota intestinal normal: Conceitos , composição e funções. *Temas de Pediatria*, n 76. ,Nestlé Nutrição, 2003.

QIN, J.; LI R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D.R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE,

P.; BERTALAN, M.; BATTO, J.M.; HANSEN, T.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H.B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBAACH, J.; MetaHIT Consortium; BORK, P.; EHRLICH, S.D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, v.464, n.4, p.59-65, 2010.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res*, V. 41, p D590-D596, 2013.

REHMAN, A.; LEPAGE, P.; NOLTE, A.; HELLMIG, S.; SCHREIBER, S.; OTT, S.J. Transcriptional activity of the dominant gut mucosal microbiota in chronic inflammatory bowel disease patients. *J Med Microbiol.*, v. 59, p. 1114-1122, 2010.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA, Jr J.F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and coverage pyrosequencing. *J Dent Res*, v.89, p.980–984, 2010.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied And Environmental Microbiology*, v.66, n.6, p. 2541-2547, 2000.

RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; LARSEN, F.; JAKOBSEN, K.S.; Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16s rna sequences from the variable regions V6, V7, and V8. *Applied And Environmental Microbiology*, v.63, n.7, p. 2593-2599, 1997.

SCHIFFRIN, E. J. Funções de defesa e homeostática dos probióticos no sistema imune In: Trabulsi, L. R.; Schiffrin, E. J.; Carneiro-Sampaio, M. M. S.; Saavedra, J.M. Os probióticos e a saúde infantil.” *Temas de Pediatria*, 2000.

SCHIFFRIN, E.J.; BLUM, S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr*, v.56, Suppl 3, p.S60-S4, 2002.

SCHLOSS, P.D; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, HALL, J.R; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; HORN, D.J.V.; WEBER, C.F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, v.75(23), p.7537-41, 2009.

SHEN, X.J.; RAWLS, J.F.; RANDALL, T.; BURCAL, L; MPANDE, C.N.; JENKINS, N.; JOVOV, B.; ABDO, Z.; SANDLER, R.S.; KEKU, T.O. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes.*, v.1, n.3, p.138-147, 2010.

SIPOS, R.; SZÉKELY, A.J.; PALATINSZKY, M.; MÁRIALIGETI K.; NIKOLAUSZ M. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on RNAr 16S gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol.*, v.60, p. 341-350, 2007.

SIPOS, R.; SZÉKELY, A.J.; RÉVÉSZ, S.; MÁRIALIGETI K. Addressing PCR in environmental microbiology studies. *Bioremediation, methods in molecular biology*, 599,cap.3, p.37-58, 2010.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, p. 846–849, 1994.

STRAUSBERG, R.L.; LEVY, S.; ROGERS, Y.H. Emerging DNA sequencing technologies for human genomic medicine. *Drug Discov Today*, v.13, n. 13/14, p. 569-77, 2008.

TADDEI, C.R.; OLIVEIRA, F.F.; DUARTE, R.T.D.; TALARICO, S.T.; TAKAGI, E.H.; IRINO, I.R.; GOMES, F.M.S, BRANDT, K.; MARTINEZ, M.B. High abundance of *Escherichia* during the establishment of fecal microbiota in Brazilian children. Submetido para publicação em 2013.

TANNOCK, G.W. The normal microflora: an introduction. In: Tannock GW, editor. Medical Importance of Normal Microflora. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; p. 1-23, 1999.

TANNOCK, G.W. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*, v.73, p.410S-4S, 2001.

TANNOCK, G.W. New perspectives on the gut microbiota: implications for future research. *Gastroenterology clinics Am*, v.34, p.361-382, 2005.

TOTTEY, W.; DENONFOUX, J.; JAZIRI, F.; PARISOT, N.; MISSAOUI, M.; HILL, D.; BORREL, G.; PEYRETAILLADE, E.; ALRIC, M.; HARRIS, H.M.; JEFFERY, I.B.; CLAESSEON, M.J.; O'TOOLE, P.W.; PEYRET, P.; BRUGÈRE, J.F. The human gut chip "HuGChip", an explorative phylogenetic microarray for determining gut microbiome diversity at family level. *PLoS One*, v.8, n. 5, p. 1-12, 2013.

TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol.*, v. 46, n.4, p. 327-338, 1999.

VAEL, C.; DESAGER, K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr*, v.21, p.794-800, 2009.

VRIEZE A.; HOLLEMAN, F.; ZOETENDAL, E.G.; DE VOS, W.M.; HOEKSTRA, J.B.L.; NIEUWDORP, M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, v.53, p.606–613, 2010.

ZOETENDAL, E.G.; COLLIER, C.T.; KOIKE, S.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H.R. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.*, v.134, p.465-472, 2004.

WALL, R.; HUSSEY, S.G.; RYAN, C.A.; O'NEILL, M.; FITZGERALD, G.; STANTON, C.; ROSS, R.P. Presence of two *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* probiotic strains in the neonatal ileum. *The ISME Journal*, v.2, p.83-91, 2008.

WALKER, A.W.; INCE, J.; DUNCAN, S.H.; WEBSTER, L.M.; HOLTROP, G.; ZE, X.; BROWN, D.; STARES, M.D.; SCOTT, P.; BERGERAT, A.; LOUIS, P.; MCINTOSH, F.; JOHNSTONE, A.M.; LOBLEY, G.E.; PARKHILL, J.; FLINT, H.J. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME Journal*, v.5, p.220-230, 2011.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n.2, p. 697-703, 1991.

WINKLER, P.; GHADIMI, D.; SCHREZENMEIR, J.; KRAEHENBUHL, J.P. – Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J. nutr.*, v.137, p.756S-772S, 2007.

8. ANEXO – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer do CEP/FCF/49/2012
Protocolo CEP/FCF/607
CAAE: 0068.0.018.198-11

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Flora intestinal normal da criança: desenvolvimento e características
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Patrocinadores:	FAPESP

II – Sumário Geral do Protocolo

O intestino do recém-nascido é estéril mas logo é colonizado por microorganismos do meio externo, principalmente os presentes no canal vaginal da mãe. As bactérias começam a aparecer nas fezes horas após o nascimento e sua população aumenta progressivamente durante a primeira semana de vida. Mais de 99% da microbiota fecal cultivável é representada por apenas 30-40 espécies bacterianas, refletindo a dificuldade ainda existente em se conhecer toda a diversidade de microorganismos residentes no trato gastrointestinal (TGI). Avanços neste campo do conhecimento foram obtidos com a utilização dos métodos moleculares, permitindo a identificação de bactérias não cultiváveis. Assim, tendo em vista 1- a importância de se conhecer a microbiota humana, 2- que o estudo da microbiota humana utilizando a metagenômica é relativamente recente e é baseado, principalmente, em protocolos de estudos ambientais, e 3- a presença da diversidade de resultados encontrados na literatura, o presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes protocolos para a validação do uso da metagenômica para o estudo da microbiota intestinal, utilizando, para tanto DNA bacteriano já extraído de amostras de fezes.

Objetivos do estudo:

- Avaliar diferentes protocolos para a validação do uso da metagenômica para o estudo da microbiota intestinal humana;
- Detectar e quantificar os principais gêneros de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de 10 crianças de zero a doze meses por PCR tempo real;
- Avaliar o estabelecimento e a diversidade da microbiota bacteriana do tubo gastrointestinal de recém-nascidos humanos pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

Tipo de estudo: longitudinal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Descrição da Casuística:

Serão utilizadas amostras de **DNA bacteriano total**, congeladas a -80°C . Em uma primeira fase do projeto, já realizada, foram coletadas amostras de fezes das quais foram isolados o DNA bacteriano. Nesta fase, serão utilizadas essas amostras de DNA da bactéria que se encontra congeladas a -80°C .

III – Situação do Protocolado: APROVADO em reunião de 28/05/2012.

Cabe ao pesquisador responsável:

- Comunicar ao CEP:
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório final (modelo do CEP).

São Paulo, 29 de maio de 2012.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

São Paulo, 6 de agosto de 2011.

Ilmo(a), Sr(a).

Profa. Dra. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas – Edifício IV
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Subprojeto de Pesquisa** “Validação do uso da metagenômica como ferramenta para o estudo da microbiota fecal humana” - **Orientador(a):** Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez – **Pesquisador(a) Executante:** Juliana Bannwart de Andrade Machado - **Registro CEP-HU/USP:** 574/05 B – **SISNEP CAAE:** --

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 5 de agosto de 2011, analisou o Subprojeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**.

Trata-se o referido Estudo de proposta de continuidade do Projeto de Pesquisa “*Flora intestinal normal da criança: desenvolvimento e características*”, aprovado por este Comitê, em 19 de agosto de 2005.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra “c”.

O primeiro relatório está previsto para 5 de agosto de 2012.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP