



O papel da bioinformática na análise do microbioma da cavidade bucal

Kerber, M.¹, Arthur R. A.¹

¹Laboratório de Bioquímica e Microbiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Introdução

A composição do microbioma oral é influenciada pelas condições do ambiente oral. Alterações nas condições locais podem afetar as interações dos micro-organismos que fazem parte deste microbioma e assim, determinar se o estado da relação entre os micro-organismos e o hospedeiro é simbiótico ou não. Quando relações disbióticas são estabelecidas ocorre o aumento da proporção de micro-organismos relacionados a doenças bucais, dentre as quais se destaca a doença cárie dentária. No grupo de pesquisa da Cariologia UFRGS, diversos estudos têm sido conduzidos para avaliar o papel do microbioma na cárie dentária.

No entanto, a quantidade de dados oriundos de pesquisa com metagenômica/metatranscriptoma é extensa e faz com que a equipe de trabalho necessite de um bioinformata para uma correta análise dos dados. A bioinformática, então, torna-se uma poderosa ferramenta, sendo pilar fundamental na análise do microbioma. Diversas “pipelines” estão disponíveis para a análise dos dados. A escolha de uma ferramenta adequada é fundamental na obtenção dos resultados.

Objetivo

Analisar sequências brutas do microbioma de amostras clínicas de biofilme supragengival, utilizando como ferramenta de bioinformática a “pipeline” SqueezeMeta.

1. Diferentes condições de atividade de cárie analisadas

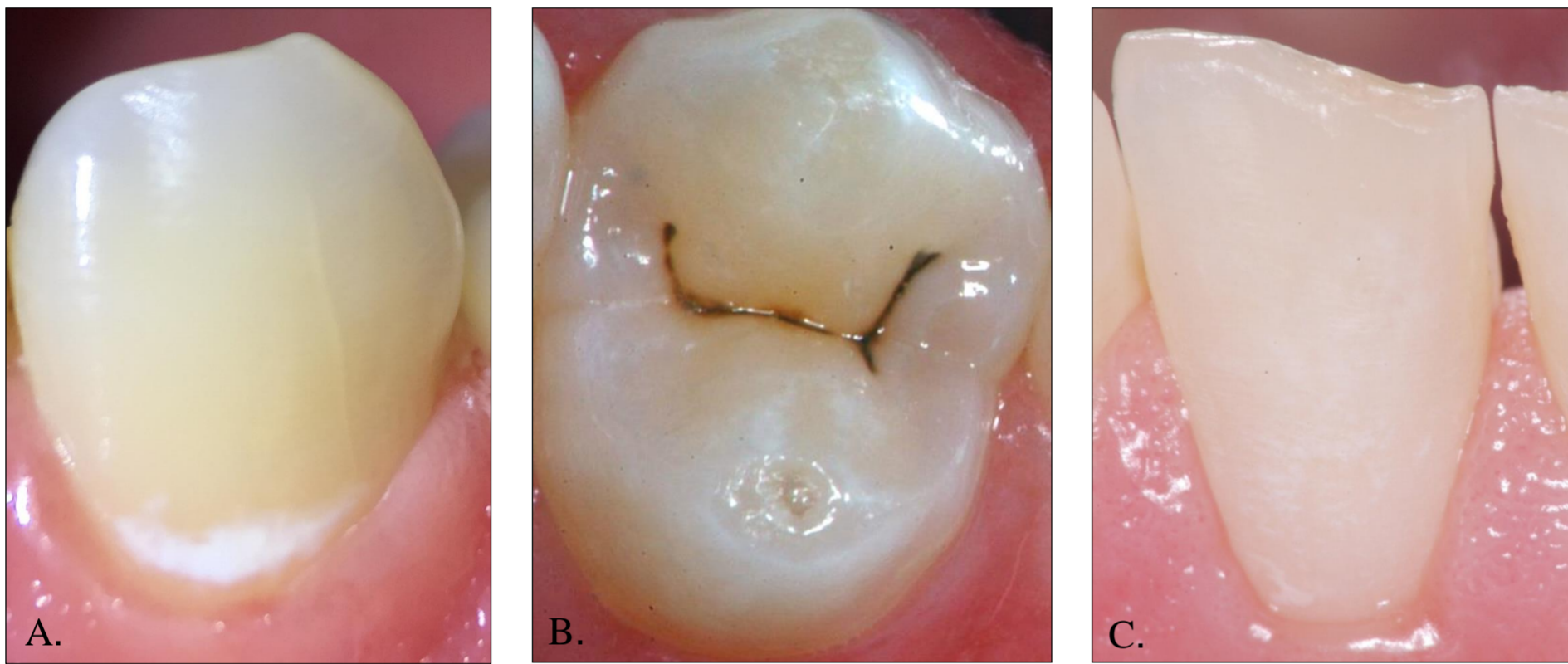


Figura 1. Foram utilizadas três tipos de superfícies dentais para coleta dos biofilmes. Dentes com cáries ativas – CA – (Fig. 1a), dentes com cáries inativas – CI – (Fig. 1b) e dentes com a superfície hígida, livres de cárie – CF – (Fig. 1c).

2. Material e Métodos

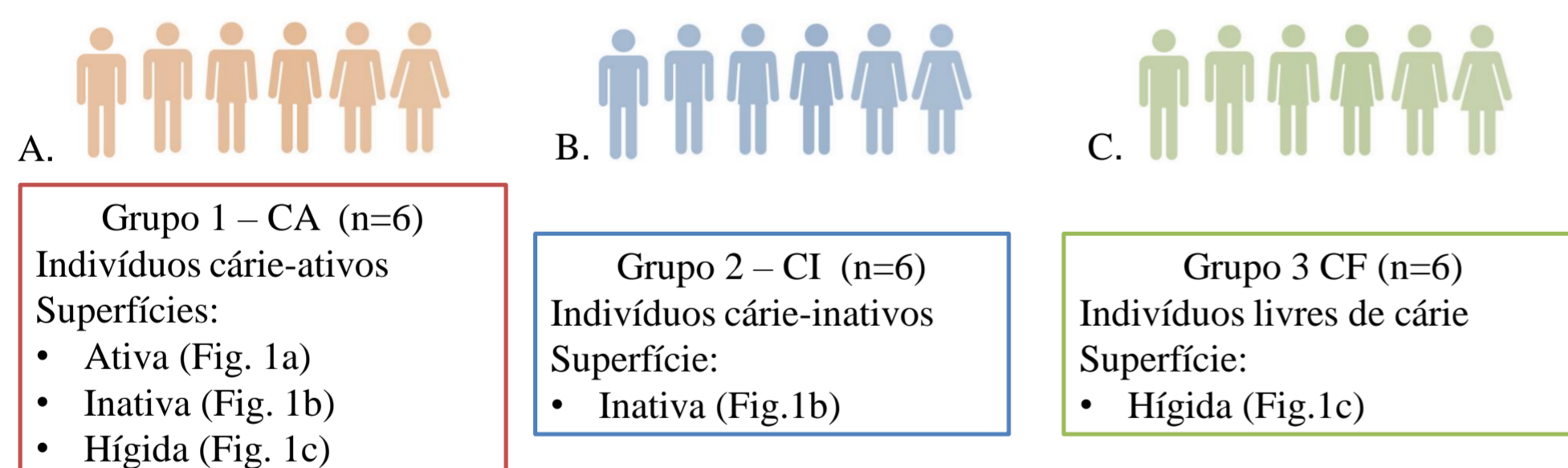


Figura 2. Três grupos experimentais foram montados. Indivíduos que possuam cáries ativas (Fig. 2a), indivíduos que possuam apenas cáries inativas (Fig. 2b) e indivíduos sem cáries (Fig. 2c). Os indivíduos com cáries ativas possuam as três superfícies analisadas do estudo presentes para coleta, sendo assim foram coletados biofilmes das três (exemplificadas na Figura 1).

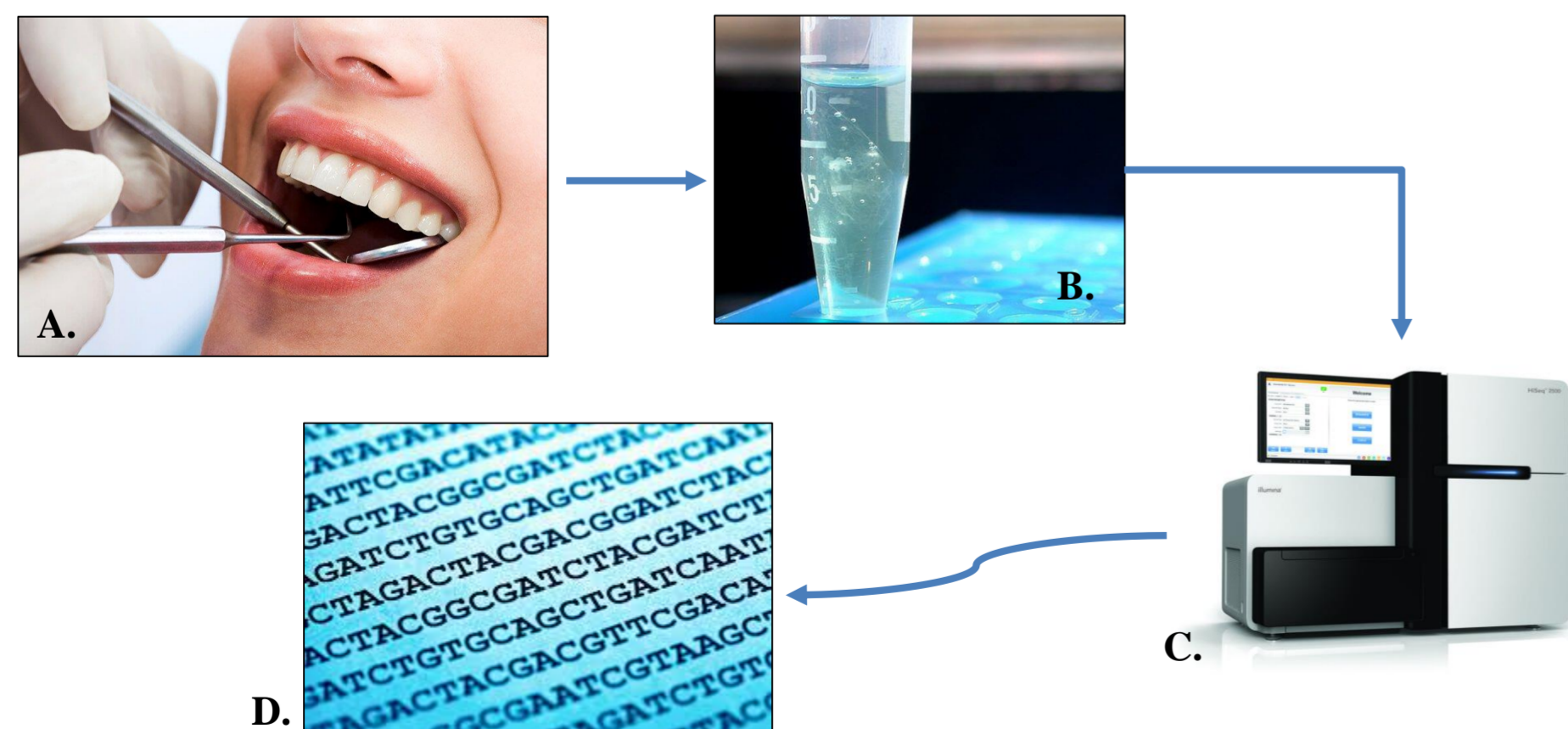


Figura 3. Após a coleta do biofilme (Fig. 3a) foi extraído o RNA total das amostras utilizando o kit “UltraClean® Microbial RNA Isolation Kit”, o DNA complementar foi confeccionado com o kit TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc) (Fig. 3b) as amostras foram sequenciadas utilizando o equipamento Illumina HiSeq 3000® (Fig. 3c) e os fragmentos de DNA sequenciados serão analisados (Fig. 3d).

APOIO:



3. Remoção de sequências com baixa qualidade

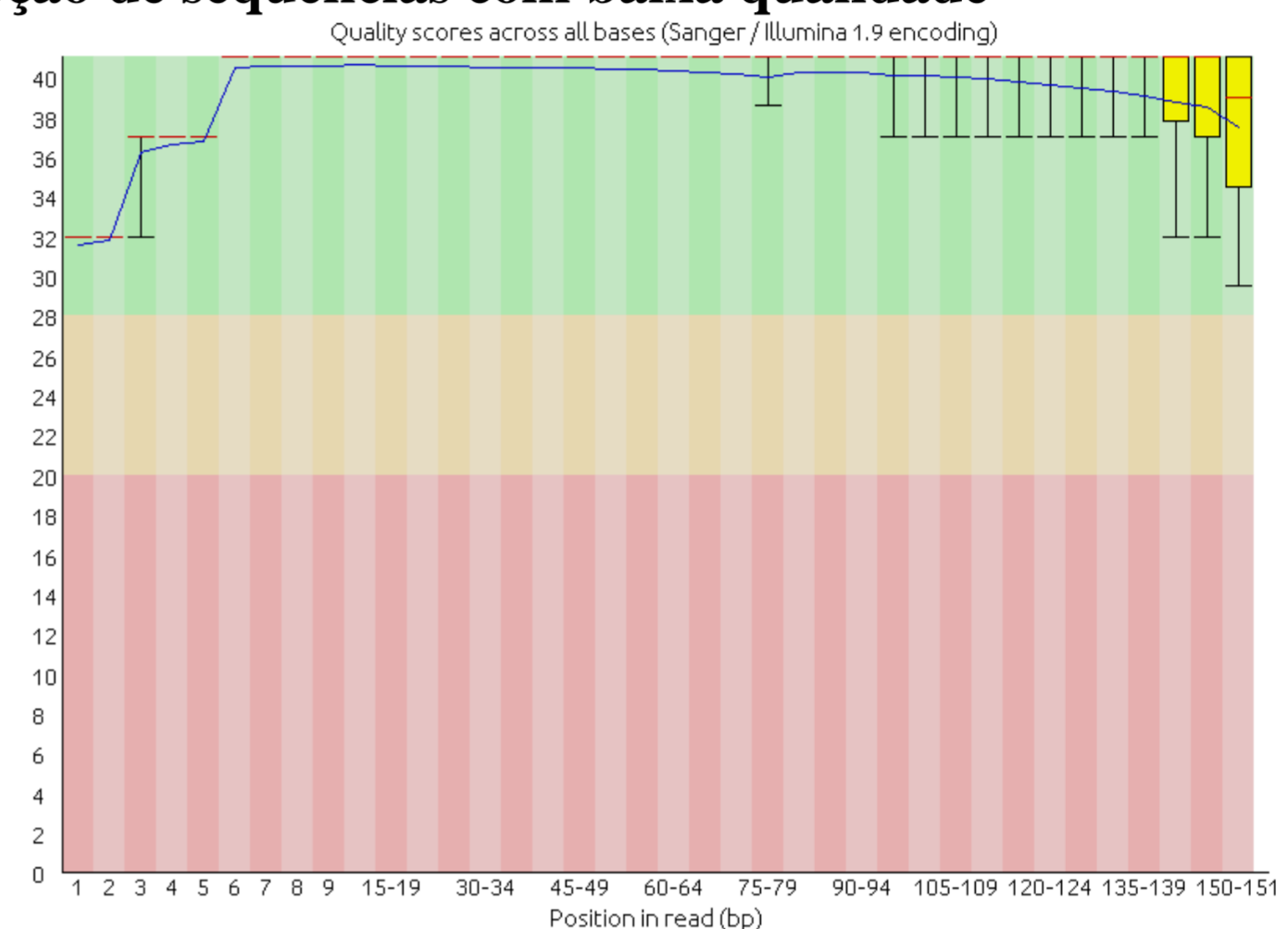


Figura 3. Os fragmentos de DNA sequenciados (reads) foram tratados com o software Trimmomatic a fim de remover sequências de baixa qualidade (com phred score médio menor que 15) e com um tamanho menor do que 70 pares de base (bp). As sequências (reads) restantes obtidas possuem um phred score considerado ótimo e um tamanho de fragmento de no máximo 151bp. A figura mostra uma visualização da qualidade geral representativa dos reads das amostras, gerada através do software FastQC.

4. Montagem e anotação dos genomas

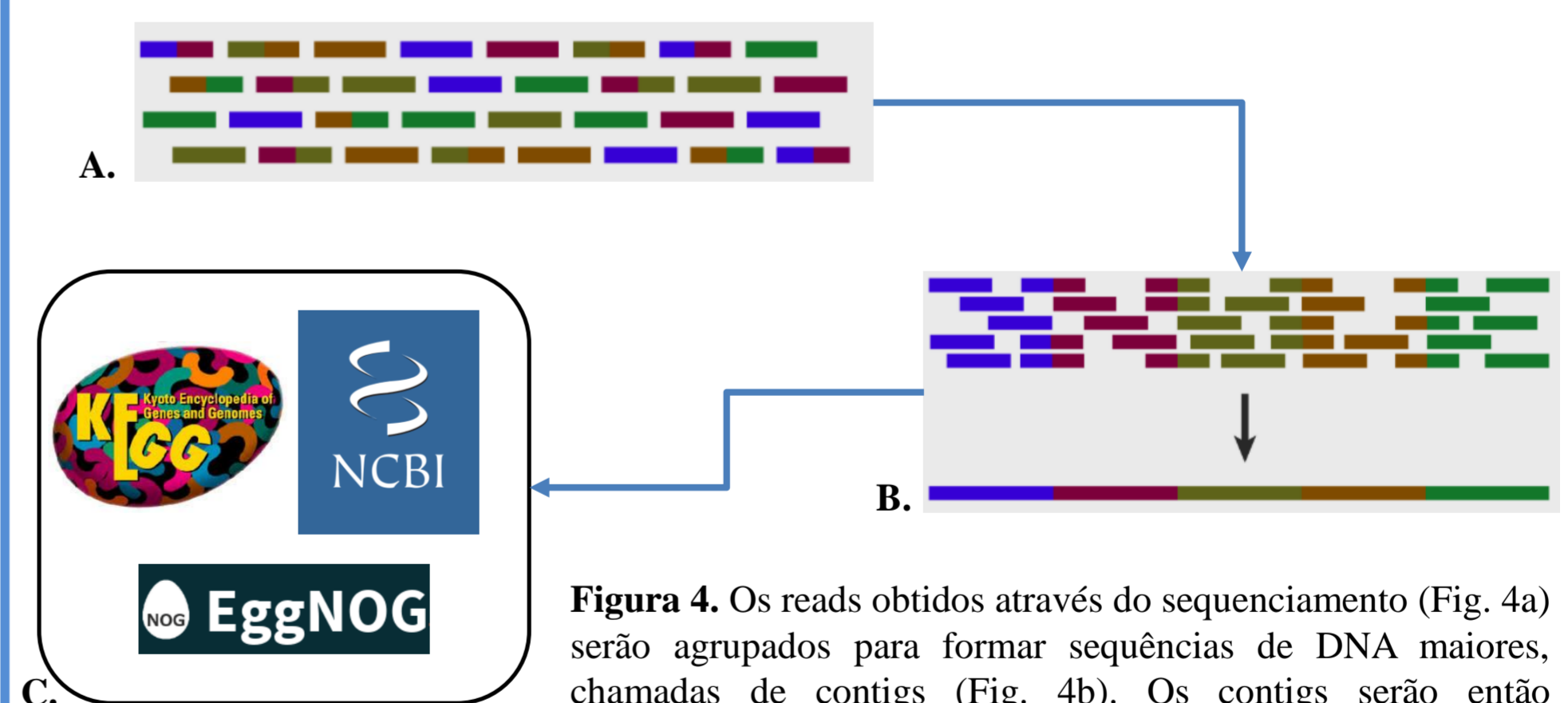


Figura 4. Os reads obtidos através do sequenciamento (Fig. 4a) serão agrupados para formar sequências de DNA maiores, chamadas de contigs (Fig. 4b). Os contigs serão então comparados à bancos de dados disponíveis publicamente para obter informações sobre taxonomia e função dos genes identificados (Fig. 4c).

Conclusões e perspectivas futuras

A análise dos dados – que está ocorrendo no momento – possibilitará conclusões sobre a relação entre os micro-organismos identificados nas amostras, bem como a abundância e diversidade das diferentes espécies de vírus, bactérias, fungos e vírus presentes no microbioma oral. Espera-se que as distintas superfícies analisadas (CA, CI e CF) apresentem diferenças estatisticamente significativas tanto em nível de diversidade de micro-organismos bem como de genes diferencialmente expressos. Assim, espera-se obter uma relação entre as diferenças do microbioma da cavidade oral com as diferentes condições de saúde e atividade de doença cárie.

Referências:

- J. Tamames and F. P. Sánchez (2014) “SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis Pipeline”.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., et al. (2016). EGGNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.
- Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopaedia of genes and genomes.
- Wu, Y. W., Simmons, B. A., and Singer, S. W. (2015). MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets.