

MICROBIOTA DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR DE MACACOS-PREGO (*Sapajus spp.*) CATIVOS ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO

FACIOLI, Fernanda Luiza¹;
PEDROTTI, Luis Fernando¹;
ATAÍDE, Michelli Westphal de¹;
SILVA, Arthur Nery da¹;
ZANELLA, Giovana Ciacci¹;
CANTÃO, Maurício Egídio²;
LOSS, Caren Chaves¹;
ZANELLA, Ricardo^{1,3}.

Recebido: 10/02/2020

Aceito: 28/04/2020

¹Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo;

²Embrapa Suínos e Aves; ³Programa de Pós-Graduação em BioExperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo.

RESUMO

O sequenciamento do gene 16S rRNA é uma abordagem de grande eficiência para a identificação de microrganismos presentes em uma determinada amostra. Através da sua utilização, tornou-se possível caracterizar diferentes microbiomas. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a microbiota do trato respiratório inferior das espécies *Sapajus apella* e *Sapajus nigritus* (macaco-prego), em um total de 5 animais mantidos sob cuidados humanos em mantenedor conservacionista, sendo 2 fêmeas e 3 machos, a partir de lavados broncoalveolares, utilizando a análise metagenômica. Para coleta do aspirado foi utilizada técnica de broncoscopia com sonda uretral estéril. Foram sequenciados 104.719 reads e identificados 181 gêneros bacterianos, compreendendo 396 OTUs. Os gêneros bacterianos mais abundantes encontrados nos animais foram *Neisseria* (31,49%), *Gemella* (8,55%), *Abiotrophia* (6,51%), *unclassified gender of Pasteurellaceae* (5,33%), *Capnocytophaga* (3,91%), *Aggregatibacter* (3,51%), *Paenibacillus* (2,94%), *Actinobacillus* (2,92%), *Streptobacillus* (2,66%) e *Leptotrichia* (2,63%). Foi observada ampla variação individual, bem como uma grande diversidade de microrganismos dentro da mesma amostra. Não foi verificada associação espécie-específico e/ou sexo-específico dos microrganismos identificados nos animais. Os resultados obtidos apresentam similaridade com investigações realizadas em humanos e outros animais. Este trabalho corresponde a primeira caracterização da microbiota aérea inferior de macacos-prego através do sequenciamento da região V3-V4 do gene bacteriano 16S rRNA.

Palavras-chave: Microbioma broncoalveolar. Primatas. Metagenômica. Microrganismo.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o avanço técnico-científico revolucionou os métodos de diagnósticos e de detecção de agentes causadores de enfermidades, possibilitando uma detecção precisa de microrganismos provenientes de diferentes meios, dentre elas podemos citar as técnicas de sequenciamento metagenômico (TRINGE; RUBIN, 2005). O primeiro genoma de uma bactéria não cultivável foi obtido através de sequenciamento em 1998 (FRASER, 1998). Foi através desse feito que se abriram as portas para a investigação de diferentes microrganismos considerados inacessíveis previamente, especialmente aqueles que não conseguem sobreviver fora dos seus hospedeiros, como patógenos ou constituintes de um microbioma (simbiontes) e os que não crescem em culturas microbiológicas (TRINGE; RUBIN, 2005).

O sequenciamento metagenômico investiga regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA para a caracterização dos diferentes perfis taxonômicos encontrados em uma determinada amostra (NICOLA et al., 2017). Seus resultados são mais precisos quando comparados aos métodos baseados em cultura microbiana, tendo em vista que uma grande quantidade de microrganismos não é cultivável (MORRIS et al., 2013). Desse modo, por ser uma técnica que utiliza a biologia molecular e ser independente de meio de cultura, o sequenciamento do material genético extraído de microrganismos permite a identificação de complexas comunidades microbianas e suas interações presentes em diferentes ambientes (CHARLSON et al., 2011; MORRIS et al., 2013).

Por muito tempo, acreditou-se que a presença de bactérias nas vias aéreas inferiores estava associada apenas a fenômenos patológicos, pressupondo que os pulmões se apresentavam estéreis em indivíduos saudáveis. Entretanto, a utilização de métodos independentes de cultura pôde comprovar a existência de uma microbiota residente nestes locais (SEGAL et al., 2014). Primeiramente estes achados foram explicados como possíveis contaminações pela cavidade oral e trato aéreo superior durante o procedimento de coleta de material ou microaspirações (CHARLSON et al., 2011; MORRIS et al., 2013). Mais tarde, autores como Dickson et al. (2014) mostraram que todo o trato respiratório compreende um ecossistema microbiológico que é contínuo, mas varia em composição por sua extensão devido a diversos

fatores. Definiu-se então que os pulmões estão expostos constantemente ao ambiente e às bactérias presentes no trato respiratório superior, esperando-se assim que não sejam livres de microrganismos (MORRIS et al., 2013).

Caracterizar a microbiota das vias aéreas inferiores de animais saudáveis ou sem sinais clínicos de doenças respiratórias traz informações importantes relacionadas com outros microambientes anatomicamente associados. Com maior relevância ainda, permite comparar e entender as mudanças que acontecem quando o organismo está sob condição de enfermidade (MORRIS et al., 2013). Estudos caracterizando o trato respiratório normal (CHARLSON et al., 2010; CHARLSON et al., 2011; DICKSON et al., 2014) e com influência de doenças que afetam o sistema pulmonar (ERB-DOWNWARD et al., 2011) já foram realizados em humanos, bem como comparando a microbiota de indivíduos fumantes e não fumantes (MORRIS et al., 2013). O trato respiratório superior e inferior de bovinos também já foi alvo de sequenciamento metagenômico (NICOLA et al., 2017). Porém, raros estudos trazem informações a respeito do microbioma da porção broncoalveolar de primatas não-humanos hígidos.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar pela primeira vez o trato respiratório inferior de primatas de espécies pertencentes ao gênero *Sapajus* (*Sapajus apella* e *Sapajus nigritus*), submetidos a lavagem broncoalveolar, sem sinais clínicos de doença respiratória, através de sequenciamento do gene bacteriano 16S rRNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de lavado broncoalveolar foram coletadas de cinco espécimes de macaco-prego, por meio de sonda uretral estéril com antisepsia prévia da cavidade oral e sonda guiada por endoscópio rígido. Dois animais pertenciam a espécie *S. apella*, uma fêmea (SA_F) e um macho (SA_M) e três da espécie *S. nigritus*, uma fêmea (SN_F) e dois machos (SN_M1 e SN_M2), mantidos sob cuidados humanos em um mantenedor conservacionista do Rio Grande do Sul, Brasil (Número de cadastro de acesso ao patrimônio genético no SISGEN - A5DDF1A; Número de autorização oficial do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais, IBAMA (SISBIO) – 33128-2). Os animais foram capturados com auxílio de puçás seguido de contenção química com tiletamina e zolazepan (5 mg.kg⁻¹ IM), e foram

encaminhados a sala de procedimento seguido de indução com diazepam ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ IV) e propofol (4 mg.kg^{-1} IV). Para manutenção anestésica foi utilizado isoflurano vaporizado em oxigênio a 100% em sistema aberto em máscara facial, buscando evitar a ocorrência de hipóxia por hipoventilação transitória. Foram realizadas avaliações de hemograma, alanina aminotransferase (ALT), albumina, aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), creatinina, ureia e colesterol (Tabela 1). Para a técnica de lavado traqueobrônquico guiada por endoscópio, os indivíduos foram dispostos em decúbito ventral, com a cabeça posicionada em um ângulo de 45° , e com o auxílio de gases a cavidade oral foi mantida aberta durante o exame. Após antisepsia prévia com clorexidina aquosa 0,2%, uma sonda uretral estéril nº 4 foi introduzida através da traqueia, guiada com um endoscópio rígido de 2,7 mm e 30° , com sua bainha de proteção (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) acoplados ao sistema de vídeo portátil (Tele Pack X Led, Karl Storz, Tuttlingen, Germany). Após posicionar a sonda anteriormente a carina, foram infundidos $1,5 \text{ ml.kg}^{-1}$ de NaCl 0,9% seguido de sucessivas aspirações do líquido com seringas de 60 ml.

Ao término do procedimento os animais receberam suplementação de oxigênio por 15 minutos, furosemida (2 mg.kg^{-1} IV) e permaneceram sob monitoração dos parâmetros vitais por 30 minutos. Após cada procedimento, o endoscópio era higienizado com clorexidina alcoólica à 0,5% e permaneceu em imersão por pelo menos 20 minutos em solução à base de glutaraldeído 2% para desinfecção.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em criotubos estéreis identificados, congeladas a uma temperatura de -20°C e posteriormente processadas. O DNA de cada aspirado foi extraído a partir do protocolo padrão do kit ExtractMe (Blirt/SA®), conforme recomendações do fabricante. Após a extração do DNA, a concentração e qualidade do material genético foram aferidas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop®. A concentração de DNA variou de 3,5-27,1 ng/ μL . Em relação à qualidade de material genético, obtiveram-se valores adequados de A260/A280 (1,8-2,5), e de A260/A230 (1,8). Para verificação da presença de DNA bacteriano foi realizada PCR para amplificação de um fragmento da região V3-V4 do gene 16S rRNA, com os *primers* 341F- ATTACCGCGGCTGCTGG e 534R-CCTACGGGAGGCAGCAG (BRU, 2008), utilizando 35 ciclos com temperatura de

anelamento de 55 °C. Sua visualização foi aferida em gel de agarose a 2% com auxílio do transiluminador.

Posteriormente, o DNA das amostras foi diluído a uma concentração total de 500 ng e enviado à empresa Neopropecta® para realização do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA utilizando NGS através do equipamento MiSeq (Illumina – San Diego, EUA) previamente descrito por Christoff et al. (2017). As amostras foram sequenciadas utilizando bibliotecas Single-End para fragmentos de 300 pb da região V3-V4 do gene 16S rRNA. Para o controle de qualidade, foi utilizado o programa Seqclean (ZHBANNIKOV et al., 2017), removendo adaptadores e *reads* de baixa qualidade, tamanhos inferiores a 250 pb e quimeras; seguido pelo *software* Mothur v1.35.1 (SCHLOSS et al., 2009) para a classificação taxonômica das OTUs, baseado no banco de dados Silva Database (release 132) (QUAST et al., 2013), e para criar os índices de riqueza (Chao) e diversidade (Shannon).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos levaram em média $10,1 \pm 3,8$ min. A porcentagem de solução recuperada após a infusão foi de $9,5 \pm 3,2\%$ (0,3 a 0,5 ml) do total de $1,5 \text{ ml.kg}^{-1}$. Todas as amostras resultaram volume suficiente para as análise de microbiota. Os valores hematológicos se mantiveram entre os níveis normais para a espécie (FERREIRA et al., 2018; WIRZ et al., 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores hematológicos e bioquímicos de macacos-prego (*Sapajus sp.*) submetidos a lavado traqueobrônquico videoassistido para análise metagenômica. Intervalo de referência (FERREIRA et al., 2018; WIRZ et al., 2008*).

Hematologia	Machos (N=3)		Fêmeas (N=2)		Intervalo de Referência
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Eritrócitos (X10⁶ μl)	5,79	0,08	4,58	0,39	3,66 – 7,64
Hemoglobina (g/dL)	13,60	0,10	11,75	0,07	9,50 - 14,70
Hematócrito (%)	43,00	1,25	37,15	0,35	32,00 – 45,00
VCM	74,16	2,45	81,45	7,84	65,0 – 79,0 *
CHCM	31,63	0,83	31,65	0,49	26,80 - 35,90
Proteínas Plasmáticas Totais(g/dL)	7,60	0,34	6,50	0,30	3,30 – 8,80 *
Plaquetas (X10⁶ μl)	315,00	83,51	205,00	162,63	164,93 – 376,51
Leucócitos Totais (/μl)	11533,33	4600,36	6600,00	2545,58	3920,00 – 18690,00
Neutrófilos Segmentados(/μl)	6407,66	1932,53	3210,00	1756,45	1110,00 – 14310,00
Eosinófilos(/μl)	745,00	918,33	480,00	67,88	0,00 – 1520,00
Monócitos(/μl)	676,66	460,30	318,00	93,33	0,00 – 4670,00
Linfócitos(/μl)	3704,00	2600,44	3024,00	950,35	330,00 – 9260,00
Albumina (g/L)	3,78	0,49	3,32	0,21	3,80 – 5,40 *
ALT (UI/L)	37,33	8,32	29,5	19,09	17,00 – 111,00 *
AST (UI/L)	124,33	93,36	39	2,82	23,00 – 125,00 *
Colesterol (mg/dL)	179,00	32,18	126,50	21,92	62,00 – 223,00 *
Creatinina(mg/dL)	0,70	0,03	0,55	0,14	0,38 – 1,47 *
FA (UI/L)	100,33	16,62	64,50	20,50	31,00 – 642,00 *
Ureia (mg/dL)	16,00	4,58	9,00	5,65	6,00 – 73,00 *

Inicialmente, o número total de *reads* sequenciados obtidos foi de 155.342, incluindo todas as amostras. Após a primeira etapa de controle de qualidade, executada pelo programa Seqclean, houve uma redução média de 8,7% das sequências, obtendo-se um total de 141.848 *reads*. Na execução do controle de qualidade pelo *software* Mothur, foram removidos mais 37.129 *reads* (26,2%), resultando ao final em 104.719 *reads* sequenciados (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de *reads* por amostra antes e depois do controle de qualidade.

Amostra	<i>Reads</i> Pré CQ	<i>Reads</i> Pós CQ	Redução (%)
SA_F	10.162	9.210	9.36%
SA_M	56.256	51.560	8.34%
SN_F	39.524	35.984	8.95%
SN_M1	2.214	1.982	10.47%
SN_M2	47.186	43.112	8.63%
Total	155.342	141.848	8.68%
CQ Mothur	141.848	104.719	26.17%

Na microbiota do trato respiratório inferior dos macacos-prego foram identificados um total de 13 filos (Tabela 3), sendo eles *Proteobactéria* (55,28%), *Firmicutes* (26,05%), *Fusobactéria* (7,94%), *Bacteroidetes* (6,28%), *Actinobactéria* (1,89%) e Outros (2,54%).

Tabela 3 - Relação dos filos bacterianos encontrados e o número de *reads* por amostra.

Filo	Total	%	SA_F	SA_M	SN_F	SN_M1	SN_M2
<i>Proteobactéria</i>	57.887	55,27	4.531	15.626	14.505	1.312	21.913
<i>Firmicutes</i>	27.277	26,04	2.187	12.580	6.738	230	5.542
<i>Fusobactéria</i>	8.319	7,94	59	2875	2683	44	2658
<i>Bacteroidetes</i>	6.581	6,28	150	2.597	1.838	8	1.988
<i>Actinobactéria</i>	1.980	1,89	49	631	670	0	630
<i>Gracilibactéria</i>	956	0,91	3	506	113	0	334
<i>Absconditabactéria</i>	931	0,88	0	96	439	0	396
<i>Spirochaetae</i>	360	0,34	0	25	283	0	52
<i>Saccharibactéria</i>	285	0,27	15	58	168	0	44
<i>Tenericutes</i>	112	0,10	10	16	70	0	16
<i>Acidobactéria</i>	24	0,02	0	0	19	0	5
<i>Chloroflexi</i>	4	0,003	0	0	4	0	0
<i>Verrucomicrobia</i>	3	0,002	0	0	3	0	0
Total	104.719	~100	6.945	32.135	24.847	1.550	30.920

Foram identificadas 96 famílias, sendo as seguintes com representatividade superior a 1%: *Neisseriaceae* (34,45%), *Pasteurellaceae* (12,41%), *Family XI* (8,55%), *Aerococcaceae* (6,52%), *Paenibacillaceae* (2,94%), *Streptococcaceae* (1,77%), *Bacillaceae* (1,64%), *Helicobacteraceae* (1,49%), *Ruminococcaceae* (1,38%), *Lactobacillales unclassified* (1,33%), *Alcaligenaceae* (1,17%) e *Moraxellaceae* (1,08%).

Em relação aos gêneros bacterianos, foram encontrados um total de 181 gêneros (Tabela 4), (Figura 1). Sete desses foram visualizados em todos os animais, com um número elevado

e/ou similar de sequências, incluindo *Neisseria* (31,49%), *Gemella* (8,55%), *unclassified* *gender of Pasteurellaceae* (5,33%), *Streptobacillus* (2,66%), *Leptotrichia* (2,63%), *Aeribacillus* (1,48%) e *Moraxella* (0,95%). Ainda, em 4 animais (4/5) foram encontrados os gêneros *Streptococcus* (1,76%), *Rothia* (1,41%) e *Porphyromonas* (0,93%) com mais de 250 reads sequenciados na maioria destes indivíduos.

Tabela 4 - Relação dos gêneros bacterianos encontrados por amostra.

Gênero	Total	SA_F	SA_M	SN_F	SN_M1	SN_M2
<i>Abiotrophia</i>	6.820	4	4.055	371	0	2.390
<i>Acetitomaculum</i>	10	10	0	0	0	0
<i>Acetobacter</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	138	63	0	60	10	5
<i>Actinobacillus</i>	3.062	0	741	903	8	1.410
<i>Actinomyces</i>	61	0	41	13	0	7
<i>Aeribacillus</i>	1.545	477	12	933	80	43
<i>Aerococcus</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Aggregatibacter</i>	3.673	5	204	2.191	9	1.264
<i>Alcaligenaceae unclassified</i>	142	0	131	2	0	9
<i>Alloprevotella</i>	281	20	68	172	0	21
<i>Alysiella</i>	2.403	2.391	0	0	12	0
<i>Anaeroplasma</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Anaerotruncus</i>	12	12	0	0	0	0
<i>Arthrobacter</i>	6	0	0	1	0	5
<i>Atopobium</i>	7	0	0	7	0	0
<i>Bacillaceae unclassified</i>	143	106	0	32	0	5
<i>Bacillales unclassified</i>	3	0	0	0	0	3
<i>Bacillus</i>	28	17	0	11	0	0
<i>Bacteroidales S24-7 group genus</i>	89	89	0	0	0	0
<i>Bacteroidales unclassified</i>	15	0	1	8	0	6
<i>Bacteroides</i>	3	0	0	0	0	3
<i>Bacteroidetes unclassified</i>	8	0	0	7	0	1
<i>Bergeyella</i>	483	0	132	111	0	240
<i>Bosea</i>	3	0	0	0	0	3
<i>Brachybacterium</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Bradymonadales genus</i>	12	0	0	11	0	1
<i>Brevundimonas</i>	9	0	0	6	0	3
<i>Butyricoccus</i>	11	11	0	0	0	0
<i>Campylobacter</i>	796	0	98	532	0	166
<i>Candidatus Hepatintcola</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	174	15	7	141	0	11

<i>Capnocytophaga</i>	4.092	18	1.871	986	5	1.212
<i>Cardiobacterium</i>	685	5	128	472	0	80
<i>Carnobacteriaceae unclassified</i>	191	0	30	2	6	153
<i>Castellaniella</i>	684	165	0	483	26	10
<i>Catonella</i>	67	0	11	49	0	7
<i>Caulobacter</i>	7	7	0	0	0	0
<i>Cellulomonadaceae unclassified</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Cellvibrio</i>	3	0	0	2	0	1
<i>Centipeda</i>	4	0	0	4	0	0
<i>Chitinophagaceae unclassified</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Chryseobacterium</i>	3	0	1	2	0	0
<i>Cloacibacterium</i>	30	10	0	20	0	0
<i>Clostridiales unclassified</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Clostridiales vadinBB60 group genus</i>	8	8	0	0	0	0
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	6	0	0	6	0	0
<i>Comamonadaceae unclassified</i>	445	0	107	297	0	41
<i>Comamonas</i>	256	25	21	172	0	38
<i>Conchiformibius</i>	75	0	34	40	0	1
<i>Corticibacter</i>	88	0	16	65	0	7
<i>Corynebacterium</i>	304	0	46	188	0	70
<i>Corynebacterium 1</i>	12	5	0	7	0	0
<i>DA101 soil group genus</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	4	0	4	0	0	0
<i>Desulfovibrio</i>	60	60	0	0	0	0
<i>Devosia</i>	10	0	0	7	0	3
<i>Diaphorobacter</i>	5	3	0	2	0	0
<i>DS-100</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Eikenella</i>	28	0	11	0	0	17
<i>Enterobacter</i>	8	0	0	8	0	0
<i>Enterobacteriaceae unclassified</i>	4	0	0	4	0	0
<i>Enterococcus</i>	9	0	0	8	0	1
<i>Escherichia-Shigella</i>	61	3	0	55	0	3
<i>Faecalibacterium</i>	6	0	0	0	0	6
<i>Family XIII genus</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Family XIII UCG-001</i>	4	4	0	0	0	0
<i>Firmicutes unclassified</i>	22	22	0	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Flectobacillus</i>	5	0	0	5	0	0
<i>Frateuria</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Fusobacterium</i>	2.576	6	954	392	0	1.224
<i>Gaiella</i>	3	0	0	0	0	3
<i>Gammaproteobacteria unclassified</i>	103	2	1	92	0	8
<i>Gemella</i>	8.952	182	5.961	1.103	22	1.684
<i>Gluconobacter</i>	5	2	0	0	0	3

<i>Glutamicibacter</i>	4	0	0	3	0	1
<i>Gracilibacteria</i> genus	956	3	506	113	0	334
<i>Granulicatella</i>	149	1	80	42	0	26
<i>Haemophilus</i>	667	1	56	6	0	604
<i>Helicobacter</i>	1.564	479	8	8	1.069	0
<i>Herpetosiphon</i>	4	0	0	4	0	0
<i>Holdemania</i>	20	0	7	11	0	2
<i>Hydrogenophaga</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Intestinimonas</i>	16	16	0	0	0	0
<i>Janibacter</i>	8	0	0	0	0	8
<i>JG34-KF-161</i> genus	3	0	0	3	0	0
<i>Johnsonella</i>	102	0	27	55	0	20
<i>Kingella</i>	275	12	24	120	0	119
<i>Knoellia</i>	5	0	0	5	0	0
<i>Kocuria</i>	10	0	0	6	0	4
<i>Lachnoanaerobaculum</i>	55	0	25	13	0	17
<i>Lachnospiraceae</i> FCS020 group	3	3	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group	45	45	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-001	17	17	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae</i> unclassified	131	47	34	35	1	14
<i>Lactobacillales</i> unclassified	1.395	3	1.090	49	0	253
<i>Lactobacillus</i>	94	94	0	0	0	0
<i>Lactococcus</i>	6	0	0	3	0	3
<i>Lautropia</i>	550	24	183	172	0	171
<i>Lentimicrobiaceae</i> genus	4	0	0	0	0	4
<i>Leptotrichia</i>	2.755	30	686	1.397	2	640
<i>Leuconostoc</i>	4	0	0	4	0	0
<i>Lysobacter</i>	6	0	0	6	0	0
<i>Marmoricola</i>	7	0	0	3	0	4
<i>Massilia</i>	14	10	0	4	0	0
<i>Methylobacterium</i>	10	0	0	5	0	5
<i>Methyloversatilis</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Microvirga</i>	4	4	0	0	0	0
<i>Mitochondria</i> genus	7	0	0	7	0	0
<i>Mobilicoccus</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Mollicutes</i> RF9 genus	14	0	2	6	0	6
<i>Moraxella</i>	992	32	427	285	8	240
<i>Mycoplasma</i>	95	7	14	64	0	10
<i>Neisseria</i>	32.979	142	12.021	7.328	84	13.404
<i>Neisseriaceae</i> genus	891	0	214	121	3	553
<i>Neisseriaceae</i> unclassified	472	10	110	82	0	270
<i>Nesterenkonia</i>	3	0	0	0	0	3
<i>Novosphingobium</i>	117	44	2	67	3	1
<i>OM27</i> clade	3	0	0	3	0	0

<i>Oscillibacter</i>	6	6	0	0	0	0
<i>Paenibacillus</i>	3.081	630	9	2.255	116	71
<i>Parabacteroides</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Paracoccus</i>	8	0	0	6	0	2
<i>Parasutterella</i>	4	4	0	0	0	0
<i>Pasteurellaceae genus</i>	11	0	3	0	0	8
<i>Pasteurellaceae unclassified</i>	5.586	759	819	672	25	3.311
<i>Pelistega</i>	396	0	248	4	26	118
<i>Peptococcus</i>	8	0	8	0	0	0
<i>Peptostreptococcaceae genus</i>	379	0	19	349	0	11
<i>Peredibacter</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Phycoccus</i>	4	0	0	3	0	1
<i>Porphyromonadaceae unclassified</i>	20	0	5	3	0	12
<i>Porphyromonas</i>	976	0	357	273	3	343
<i>Prevotella</i>	159	2	54	66	0	37
<i>Prevotella 2</i>	25	0	8	5	0	12
<i>Prevotella 7</i>	5	0	0	0	0	5
<i>Prevotellaceae unclassified</i>	8	8	0	0	0	0
<i>Proteobacteria unclassified</i>	32	0	8	24	0	0
<i>Pseudarthrobacter</i>	22	0	0	13	0	9
<i>Pseudomonas</i>	117	47	0	45	14	11
<i>RB41</i>	4	0	0	4	0	0
<i>Rhizobacter</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Rhizobium</i>	20	8	0	10	2	0
<i>Roseburia</i>	24	24	0	0	0	0
<i>Rothia</i>	1.475	21	544	409	0	501
<i>Rubroacter</i>	23	20	0	0	0	3
<i>Ruminiclostridium</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Ruminiclostridium 6</i>	153	153	0	0	0	0
<i>Ruminiclostridium 9</i>	36	36	0	0	0	0
<i>Ruminococcaceae genus</i>	6	6	0	0	0	0
<i>Ruminococcaceae NK4A214 group</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	3	0	0	0	3	0
<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	1.081	18	237	647	2	177
<i>Ruminococcaceae unclassified</i>	95	95	0	0	0	0
<i>Saccharibacteria genus</i>	111	0	51	27	0	33
<i>Schlegelella</i>	5	0	0	4	1	0
<i>Sebaldella</i>	205	0	39	142	0	24
<i>Selenomonas 3</i>	179	4	0	170	0	5
<i>Sellimonas</i>	4	4	0	0	0	0
<i>Sphingomonas</i>	278	177	0	70	11	20
<i>SR1 (Absconditabacteria) genus</i>	931	0	96	439	0	396
<i>Staphylococcus</i>	26	22	0	3	0	1
<i>Stenotrophobacter</i>	3	0	0	2	0	1

<i>Streptobacillus</i>	2.783	23	1.196	752	42	770
<i>Streptococcus</i>	1.846	10	855	421	0	560
<i>Subdoligranulum</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Subgroup 7 genus</i>	7	0	0	6	0	1
<i>Taibaiella</i>	4	0	0	4	0	0
<i>Tannerella</i>	234	0	51	118	0	65
<i>Tatumella</i>	11	11	0	0	0	0
<i>Tepidimonas</i>	3	2	0	0	1	0
<i>Tersicoccus</i>	6	0	0	0	0	6
<i>Thermomonas</i>	34	5	0	27	0	2
<i>Tissierella</i>	5	0	0	5	0	0
<i>Treponema 2</i>	360	0	25	283	0	52
<i>Tyzzera 3</i>	23	23	0	0	0	0
<i>Uncultured</i>	409	72	154	88	0	95
<i>Veillonella</i>	94	0	15	56	0	23
<i>Veillonellaceae unclassified</i>	91	0	0	84	0	7
<i>Xanthomonadaceae unclassified</i>	12	0	7	4	0	1
Total	104.719	7.004	35.010	27.533	1.594	33.578

Foi verificado um total de 369 OTUs, clusterizadas em 97% (0.03), no trato respiratório inferior dos 5 espécimes de macaco-prego, variando de 243 a 33 OTUs entre os animais (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de OTUs encontradas por animal e índices de riqueza e diversidade.

ID animal	OTUs	CHAO	Shannon
SA_F	169	166,22	3,06
SA_M	146	113,38	2,78
SN_F	242	184,83	3,73
SN_M1	33	40	1,51
SN_M2	195	138,45	2,96

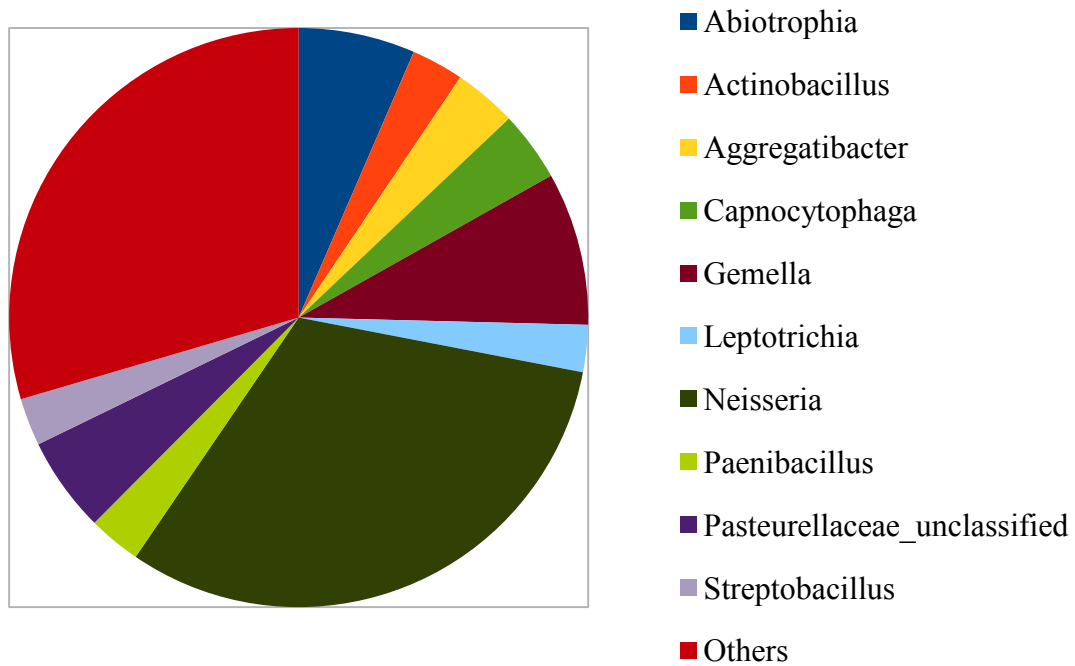


Figura 1- TOP 10 - Distribuição dos gêneros constituintes da microbiota do trato respiratório inferior dos macacos-prego.

Alguns estudos de sequenciamento metagenômico foram realizados em ruminantes, como os de Glendinning et al. (2016) que descreveram múltiplos microrganismos no trato respiratório inferior de ovinos sem sinais clínicos de doença, através de lavado bronquial. Dentre os gêneros encontrados pelos autores, através de extração e sequenciamento, *Corynebacterium* teve uma prevalência de 36%, do mesmo modo, no presente trabalho, foi verificado sua presença em quatro animais, embora em uma porcentagem bastante inferior (0,3%). *Aerococcus* e *Leuconostoc*, que tiveram prevalência de 13% e 7,2% respectivamente, nos estudos de Glendinnig, estiveram presentes em apenas um macaco-prego, com baixo número de sequenciamentos.

Ao avaliar o microbioma nasal e o trato respiratório superior de bovinos piemonteses através de *swab* nasal e de aspirado transtraqueal, Nicola et al. (2017) verificaram presença significativa dos gêneros *Mycoplasma* (68,8%) e *Moraxella* (16,6%) nos animais examinados. Em nosso estudo, verificamos a presença de *Moraxella* em todas as amostras, bem como 4 animais apresentavam *reads* correspondentes a *Mycoplasma*. Entretanto, em ambos os

casos, a porcentagem se apresentou bastante inferior àquela encontrada por Nicola e colaboradores – 0,9% e 0,09% respectivamente.

O gênero *Neisseria* teve destaque dentro dos achados do presente trabalho por possuir o maior número total de *reads*, correspondendo a 31,49% dos sequenciamentos. Ainda, esse gênero foi visualizado em todos os animais, sendo que em três deles o número de *reads* sequenciados ultrapassou os 7.000 por amostra. Inúmeras espécies desse gênero são habitantes naturais da cavidade oral e faríngea de primatas humanos (LIU et al., 2015; MUGISHA et al., 2014; WARINNER et al., 2014; ZAURA et al., 2009).

Outras investigações em humanos também revelaram similaridade com os resultados obtidos no presente trabalho. Estudos de Charlson et al. (2010) identificaram a presença dos gêneros *Streptococcus*, *Shigella*, *Acinetobacter* e *Corynebacterium* spp. através de *swabs* da nasofaringe de humanos não fumantes, bem como os filos *Firmicutes* (73%), *Proteobacteria* (12,6%), *Bacteroidetes* (7%) e *Actinobacteria* (5,6%). No trato respiratório inferior de quatro macacos-prego foram identificados três gêneros relatados por Charlson e colaboradores: *Streptococcus* (1,76%), *Acinetobacter* (0,13%) e *Corynebacterium* spp. (0,30%). Todos os quatro filos relatados por Charlson e colaboradores foram igualmente identificados em nossa pesquisa, sendo que *Proteobacteria* foi o que apresentou o maior número de sequenciamentos (55,28%), seguido de *Firmicutes* (26,05%), *Bacteroidetes* (6,28%) e *Actinobacteria* (1,89%).

Em outro estudo, utilizando lavado broncoalveolar de humanos (ERB-DOWNWARD et al., 2011), foi verificada uma grande variedade de gêneros bacterianos no trato respiratório inferior de indivíduos não fumantes, bem como foi observado nas amostras aspiradas dos cinco espécimes de macaco-prego. Os gêneros identificados pertenciam aos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria*. Esses mesmos filos foram identificados no trato respiratório inferior dos animais do presente experimento, sendo que o filo *Fusobacteria* correspondeu a 7,94% do total de sequenciamentos e foi identificado como componente da microbiota de todos os animais amostrados.

Ainda, em relação a humanos, Morris et al. (2013), utilizando a técnica de lavado broncoalveolar, identificou no pulmão de humanos saudáveis e não fumantes 12 gêneros

também presentes em pelo menos três dos cinco espécimes de macaco-prego: *Neisseria* (31,49%), *Gemella* (8,55%), *Fusobacterium* (2,46%), *Streptococcus* (1,76%), *Rothia* (1,41%), *Porphyromonas* (0,93%), *Haemophilus* (0,66%), *Prevotella* (0,20%), *Granulicatella* (0,14%), *Bacteroidales* (0,10%), *Veillonella* (0,10%) e *Actinomyces* (0,06%). O gênero *Streptococcus*, encontrado em quatro animais do presente estudo, representando 1,76% do total de reads obtidos, é considerado comensal da oro e nasofaringe de seres humanos saudáveis por Vieira e colaboradores (2007).

As investigações de Charlson et al. (2010) e Morris et al. (2013) verificaram uma relação entre a cavidade oral e o sistema respiratório em humanos, tendo em vista a presença de muitos microrganismos em comum em ambas as regiões, apesar do menor número de bactérias identificadas na região broncoalveolar. Sugere-se uma dispersão de microrganismos da cavidade oral que seja responsável por grande parte da constituição do microambiente pulmonar, inferindo também que devido a continuidade anatômica das vias, o microbioma pulmonar está em constante fluxo e modificação dos seus constituintes (MORRIS et al., 2013). Da mesma forma, Erbe e Olsen (2017) demonstraram que espécies microbianas de *Leptotrichia* foram encontradas, em sua maioria, na cavidade oral de humanos na forma comensal, mas foram associadas a diversos distúrbios, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, e, em alguns casos, esses distúrbios envolveram o trato respiratório, com broncopneumonia e edema pulmonar. Nesse contexto, foi verificada a presença do gênero *Leptotrichia* (2,63%) nas amostras de lavado broncoalveolar de todos os espécimes de macaco-prego amostrados.

Por fim, foram observadas variações individuais na microbiota do trato respiratório inferior dos animais, apesar de todos compartilharem o mesmo ambiente e dieta. Ademais, foi ainda verificada uma ampla diversidade de microrganismos dentro da mesma amostra. Essas diferenças podem ser atribuídas a variabilidade individual de cada animal. Não foi verificada associação ($p > 0,05$) espécie-específico e/ou sexo-específico entre os animais e suas respectivas microbiotas broncoalveolares, indicando que no presente caso não houve influência desses dois parâmetros nos resultados.

CONCLUSÃO

Foi visualizada uma grande variabilidade de microrganismos nas amostras de lavado broncoalveolar coletadas dos cinco espécimes de macaco-prego, sem ter sido verificada associação espécie-específico e/ou sexo-específico. Mediante os resultados obtidos, comprova-se a existência de uma colonização bacteriana característica em um ambiente anteriormente considerado estéril. Dessa forma, o sequenciamento de amplicons se mostrou uma ferramenta eficiente para a caracterização da microbiota natural do trato respiratório inferior de macacos-prego cativos, corroborado pelos resultados obtidos por outros estudos.

MICROBIOTA OF THE LOWER RESPIRATORY TRACT OF CAPUCHIN MONKEY (*Sapajus* spp.) THROUGH METAGENOMIC SEQUENCING

ABSTRACT

Sequencing of the 16S rRNA gene is a highly efficient approach for the identification of microorganisms present in a given sample. Through its use, it became possible to characterize different microbiomes. The objective of the present work was to characterize the microbiota of the lower respiratory tract of the species *Sapajus apella* and *Sapajus nigritus* (capuchin monkey), in a total of 5 animals kept under human care, 2 females and 3 males, from bronchoalveolar lavages, using metagenomic analysis. Bronchoscopy with a sterile urethral tube was used to collect the aspirate. A total of 104,719 reads were sequenced and 181 bacterial genera were identified, comprising 396 OTUs. The most abundant bacterial genera found in animals were *Neisseria* (31.49%), *Gemella* (8.55%), *Abiotrophia* (6.51%), *unclassified gender of Pasteurellaceae* (5.33%), *Capnocytophaga* (3.91%), *Aggregatibacter* (3.51%), *Paenibacillus* (2.94%), *Actinobacillus* (2.92%), *Streptobacillus* (2.66%) and *Leptotrichia* (2.63%). Wide individual variation was observed, as well as a great diversity of microorganisms within the same sample. There was no species-specific and/or sex-specific association of the microorganisms identified in the animals. The results obtained are similar to the investigations carried out in humans and other animals. This work corresponds to the first characterization of the lower aerial microbiota of capuchin monkeys through sequencing of the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene.

Keywords: Bronchoalveolar microbioma. Primates. Metagenomics. Microorganism.

MICROBIOTA DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR DE MONO CAPUCHINO (*Sapajus spp.*) MEDIANTE SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA

RESUMEN

La secuenciación del gen 16S rARN es una herramienta altamente eficiente para la identificación de microorganismos presentes en una determinada muestra. A través de su uso, se hizo posible caracterizar diferentes microbiomas. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la microbiota del tracto respiratorio inferior de las especies *Sapajus apella* y *Sapajus nigritus*, en un total de 5 animales mantenidos bajo cuidado humano, 2 hembras y 3 machos, de lavados broncoalveolares, mediante análisis metagenómico. Se usó broncoscopia con un tubo uretral estéril para recoger el aspirado. Se secuenciaron 104.719 reads y se identificaron 181 géneros bacterianos, que comprenden 396 OTUs. Los géneros bacterianos más abundantes encontrados en animales fueron *Neisseria* (31,49%), *Gemella* (8,55%), *Abiotrophia* (6,51%), *unclassified gender of Pasteurellaceae* (5,33%), *Capnocytophaga* (3,91%), *Aggregatibacter* (3,51%), *Paenibacillus* (2,94%), *Actinobacillus* (2,92%), *Streptobacillus* (2,66%) y *Leptotrichia* (2,63%). Se observó una amplia variación individual, así como una gran diversidad de microorganismos dentro de la misma muestra. No hubo asociación especie-específico y/o sexo-específico de los microorganismos identificados en los animales. Los resultados obtenidos son similares a las investigaciones realizadas en humanos y otros animales. Este trabajo corresponde a la primera caracterización de la microbiota aérea inferior de monos capuchinos, mediante la secuenciación de la región V3-V4 del gen bacteriano 16S rARN.

Palabras clave: Microbioma broncoalveolar. Primates. Metagenómica. Microorganismo.

REFERÊNCIAS

BRU, D.; MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L. Quantification of the Detrimental Effect of a Single Primer-Template Mismatch by Real-Time PCR Using the 16S rRNA Gene as an Example. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1660-1663, 2008.

CHARLSON, E. S.; CHEN, J.; CUSTERS-ALLEN, R.; et al. Disordered Microbial Communities in the Upper Respiratory Tract of Cigarette Smokers. **PLoS One**, v. 5, n. 12, e15216, 2010.

CHARLSON, E. S.; BITTINGER, K.; HAAS, A. R.; et al. Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, p. 957-963, 2011.

CHRISTOFF, A. P.; SEREIA, A. F. R.; BOBERG, D. R.; et al. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **Neoprosecta Microbiome**

Technologies, p. 1-5, 2017. Disponível em:

<<https://neoprospecta.s3.amazonaws.com/docs/Neoprospecta+-+White+Paper+-+Bacterial+NGS+sequencing+2017.pdf>> .

DICKSON, R. P.; MARTINEZ, F. J.; HUFFNAGLE, G. B. The Role of the Microbiome in Exacerbations of Chronic Lung Diseases. **The Lancet**, v. 384, p. 691–702, 2014.

ERB-DOWNWARD, J. R.; THOMPSON, D. L.; HAN, M. K.; et al. Analysis of the Lung Microbiome in the “Healthy” Smoker and in COPD. **PLoS One**, v. 6, n. 2, e16384, 2011.

ERIBE, E. R. K.; OLSEN, I. *Leptotrichia* Species in Human Infections II. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-31, 2017.

FERREIRA, A. F.; QUEIROGA, F. L.; MOTA, R. A.; RÊGO, E. W.; MOTA, S. M.; TEIXEIRA, M. G.; COLAÇO, A. Hematological profile of captive bearded capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*) from Northeastern Brazil. **Ciência Rural**, v. 48, n. 10, p. 1-7, 2018.

FRASER, C. M. Complete Genome Sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. **Science**, v. 281, p. 375–388, 1998.

GLENDINNING, L.; WRIGHT, S.; POLLOCK, J.; et al. Variability of the sheep lung microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 11, p. 3225-3238, 2016.

LIU, G.; TANG, C. M.; EXLEY, R. M. Non-pathogenic Neisseria: Members of an Abundant, Multi-habitat, diverse Genus. **Microbiology Society**, v. 161, p. 1297–1312, 2015.

MORRIS, A.; BECK, J. M.; SCHLOSS, P. D.; et al. Comparison of the Respiratory Microbiome in Healthy Nonsmokers and Smokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187, p. 1067–1075, 2013.

MUGISHA, L.; KÖNDGEN, S.; KADDU-MULINDWA, D.; et al. Nasopharyngeal Colonization by Potentially Pathogenic Bacteria Found in Healthy Semi-captive Wild-born Chimpanzees in Uganda: Chimpanzee Nasopharyngeal Colonization. **American Journal of Primatology**, v. 76, p. 103–110, 2014.

NICOLA, I.; CERUTTI, F.; GREGO, E.; et al. Characterization of the Upper and Lower Respiratory Tract Microbiota in Piedmontese Calves. **Microbiome**, v. 5, n. 152, p. 1-11, 2017.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; et al. The SILVA Ribosomal RNA Gene database project: Improved Data Processing and Web-based Tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D590-D596, 2013.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; et al. Introducing mothur: Open-source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing

Microbial Communities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SEGAL, L. N.; ROM, W. N.; WEIDEN, M. D. Lung Microbiome for Clinicians. New Discoveries about Bugs in Healthy and Diseased Lungs. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 1, p. 108–116, 2014.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA Sequencing of Environmental Samples. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 805–814, 2005.

VIEIRA, A. C.; GOMES, M. C.; FILHO, M. R.; et al. Streptococcus Pneumoniae: a Study of Strains Isolated from Cerebrospinal Fluid. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 71–78, 2007.

WARINNER, C.; RODRIGUES, J. F. M.; VYAS, R.; et al. Pathogens and Host Immunity in the Ancient Human Oral Cavity. **Nature Genetics**, v. 46, p. 336–344, 2014.

WIRZ, A.; TRUPPA, V.; RIVIELLO, M. C. Hematological and plasma biochemical values for captive tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). **American Journal of Primatology**, v. 70, p. 463-472, 2008.

ZAURA, E.; KEIJSER, B. J.; HUSE, S. M.; et al. Defining the Healthy “Core Microbiome” of Oral Microbial Communities. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 259, 2009.

ZHBANNIKOV, I. Y.; HUNTER, S. S.; FOSTER, J. A.; et al. SeqyClean: A Pipeline for High-throughput Sequence Data Preprocessing. In: ACM INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS, COMPUTATIONAL BIOLOGY, AND HEALTH INFORMATICS, 8, 2017, New York. **PROCEEDINGS**. New York: ACM-BCB' 17, 2017. P. 407-416.

Autor para correspondência:

Ricardo Zanella.

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, BR 285, São José, Passo Fundo (RS), CEP 99052-900.

ricardozanella@upf.br