

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Caracterização molecular da microbiota bacteriana da pele lesionada de indivíduo com Hanseníase

ORIENTADO: Paulo Eduardo de Souza da Silva

ORIENTADOR: Prof^a Andrea Maria Amaral Nascimento

CO-ORIENTADOR: Prof^o Edmar Chartone de Souza

BELO HORIZONTE

Março -2013

Paulo Eduardo de Souza da Silva

Caracterização molecular da microbiota bacteriana da pele lesionada de indivíduo com Hanseníase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Andréa Maria Amaral Nascimento.
Universidade Federal de Minas Gerais.

Co-orientador: Prof. Edmar Chartone de Souza.
Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
2013

*(...) “eis que veio um leproso, e o adorou, dizendo: Senhor, se quiseres, podes tornar-me limpo. E Jesus, estendendo a mão, tocou-o, dizendo: Quero; sê limpo. E logo ficou purificado da lepra”.
(Mateus 8:1-3)*

Silva, Paulo Eduardo de Souza da.

Caracterização molecular da microbiota bacteriana da pele lesionada de indivíduo com Hanseníase. [manuscrito] / Paulo Eduardo de Souza da Silva. – 2013.

64 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Andréa Maria Amaral Nascimento. Co-Orientador: Prof. Edmar Chartone de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Hanseníase - Teses. 2. Mycobacterium leprae - Teses. 3. Genética bacteriana – Teses. 4. Genética molecular – Teses. 5. Genética – Teses. 6. RNA ribossômico 16S. I. Nascimento, Andréa Maria Amaral. II. Souza, Edmar Chartone de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. IV. Título.

CDU: 576.85.095.5

Agradecimento Especial

A Deus por nos dispensar sua multiforme graça todos os dias e aos meus pais por me amarem incondicionalmente.

Agradecimentos

Ao meu criador que não se importou em revelar a sua ciência aos homens.

(...) “Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas”(…)

A minha amada família. Em especial quero agradecer ao Mateus, a Lúcia e ao meu sobrinho (a) pelo incentivo e mais que especial agradecer minha irmã Franciele que faz parte do meu mundo não apenas como irmã, mas como cientista conselheira (futura farmacêutica).

Agradecer de forma muito carinhosa a Isabela Paes Vieira (“meu grande amor”) por fazer esta caminhada possível. *Contigo eu sorri, chorei, desisti, desisti de desistir e finalmente alcancei. Essa vitória é nossa! Te amo!*

Aos meus sogros Elias e Silvana, a vó Inês e ao cunhado Jonathas por dispensarem seus preciosos cuidados comigo.

Agradecer aos amigos Otávio, Luciana, (Artur), Viviane Santos e João Paulo por sempre incentivarem minha carreira acadêmica. *Vocês são parte de tudo isso!*

Aos amigos da Igreja Batista do Barro Preto (Máfia do Bis, 1º Soprano, Grupo de teatro e Coros). *É isso mesmo gente agora sou compositor e mestre em genética. Tudo de bom!*

Aos meus professores Andrea Amaral e Edmar Chartone que não me ocultaram o conhecimento, mas que com muita dedicação me ensinaram muito durante esses dois anos. Meu muito obrigado!

Aos amigos do LGMM Patrícia (*nossa Dra Mãe*), Mariana (*Mari, será que algum dia poderei retribuir tudo o que você me ensinou e fez por mim?!*), Clarice e Monalisa (*Meninas, foi muito bom cursar estes dois anos com vocês e levem meu abraço de agradecimento ao Eclésio e ao Tiago*) Raiana (*obrigado pela amizade sempre presente*), Ana Paula (*pela grande ajuda no período de bancada*), Marcelo, Alexandre (consultor geral de bioinformática), Luisa, Maria Luiza, André, Samantha, Luiz.

As professoras Adlane e Mônica pelos momentos de conversa e de muitas risadas também. As técnicas Rosa, Andrea Reis e Paixão pelo trabalho eficiente e pela amizade.

Aos colaboradores de outros laboratórios Juliano (NAGE), Ubiraci (EMBRAPA), Professor Evanguedes Kalapothakis pela grande contribuição na execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Hermes Pardini, Dr Mário felix pela grande contribuição neste trabalho, Dr Eduardo Bambirra pelo incentivo, ao sempre amigo Neibert Cristiano que foi de fundamental importância para esta conquista. As sempre queridas, Camila, Nívea, Samanta, Dani Almeida, Carol, Fabiane (todos os técnicos), Dra Cristiane e demais amigos.

As amigas Livia de Paula e Dayanna e ao Dr. Marcelo Pascoal por sempre me motivarem.

Lista de Figuras

Figura 1: Camadas e estruturas da pele.

Figura 2: Representação esquemática da histologia da pele, em secção transversal, mostrando micro-organismos e anexos da pele.

Figura 3: Vinte sítios selecionados e sua localização no corpo humano. Os sítios representam três micro-ambientes: sebáceo (azul), seco (vermelho) e úmido (verde).

Figura 4: *Mycobacterium leprae* em processo de divisão celular – microscopia eletrônica de varredura.

Figura 5: Representação do genoma do *Mycobacterium leprae*.

Figura 6: Pele de indivíduos com Hanseníase.

Figura 7. Representação esquemática do operon de RNA ribossômico de procariotos.

Figura 8: Fragmentos de tecido humano incluídos em parafina.

Figura 9: Gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio a 0,5% contendo: (A) amplicons do gene de rRNA 16S (1 a 5) e (B) ausência de amplicons do gene de rRNA 16S (1 a 5) das amostras de lesão de pele parafinadas de indivíduos com Hanseníase. M, marcador de peso molecular 1 Kb (M) (Invitrogen- Estados unidos da América).

Figura 10: Curva de rarefação dos clones do gene de rRNA 16S bacteriano sequenciados e do número de OTUs da biblioteca.

Figura 11: Distribuição dos filos encontrados na biblioteca do gene de rRNA 16S da pele lesionada do indivíduo com Hanseníase.

Figura 12: Árvore filogenética das OTUs bacterianas encontradas na pele lesionada de indivíduo com Hanseníase (PLH – Pele Lesionada Hanseníase).

Figura 13: Distribuição dos filos encontrados no presente estudo comparados a outros dados descritos na literatura.

Figura 14: Distribuição dos gêneros encontrados na biblioteca do gene 16S de rRNA de pele lesionada de indivíduo com Hanseníase.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Prevalência e detecção da Hanseníase nas Américas.

Tabela 2: Características da biblioteca do gene de rRNA 16S de lesão de pele de indivíduo com Hanseníase.

Tabela 3: Filiação filogenética e distribuição dos clones bacterianos analisados da pele de indivíduos com Hanseníase.

Lista de Quadros

Quadro1: Sinopse da classificação das formas clínicas da Hanseníase.

Quadro 2: Condições da PCR para amplificação do gene de rRNA 16S de bactérias.

Lista de Abreviaturas

ABRALAPAC - Associação Brasileira de Laboratórios de Anatomia Patológica e Citopatologia

Ace - Abundance-based coverage estimator

COEP- UFMG – Conselho de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

DNA - Ácido desoxiribonucléico.

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HMP - Human Microbiome Project

Mb - Mega base

ml - Mililitro

MS - Ministério da Saúde

ng - Nanograma (10^{-9})

pb - pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction. “ Reação em Cadeia polimerase”

pH – Potencial hidrogeniônico

RDP - Ribossomal Database Project II

rRNA - Ácido Ribonucleotídeo Ribossômico

μ l - Microlitro

μ m - Micrometro

μ g – Micrograma

UV – Ultra Violeta

Sumário

Agradecimento Especial.....	I
Agradecimento.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE QUADROS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
SUMÁRIO	IX
RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
1 – INTRODUÇÃO.....	5
1.1 – Pele.....	6
1.2 - <i>Mycobacterium leprae</i>	10
1.3 – Hanseníase.....	12
1.4 - Distribuição mundial da Hanseníase.....	14
1.5 - Diversidade microbiana e o gene de rRNA 16S.....	16
1.6 - O operon de RNA ribossômico.....	17
1.7 - Histopatologia e os “Biobancos”	19
1.8 - Justificativa.....	21
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 - Objetivo Geral.....	23
2.2 - Objetivos Específicos.....	23
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	24

3.1 - Amostragem.....	25
3.2 - Preparo e desparafinação dos tecidos de pele embebidos em parafina para extração de DNA.....	25
3.3 - Amplificação do gene de rRNA 16S das amostras de DNA parafinado.....	26
3.3.1 - Recondicionamento das amostras.....	27
3.4 - Construção de bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S.....	28
3.4.1 - Clonagem do gene de rRNA 16S e transformação da bactéria eletrocompetente <i>Escherichia coli</i> XBlue.....	28
3.4.2 - Sequenciamento do gene de rRNA 16S e análise filogenética.....	28
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 - Amplificação do gene de rRNA 16S de bactéria.....	33
4.2 - Características da biblioteca de clones do gene de rRNA 16S.....	35
4.3 - Composição da comunidade bacteriana.....	38
5 - CONCLUSÃO.....	48
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
7 - ANEXOS.....	59

Resumo

A pele é uma barreira crítica para a sobrevivência prevenindo a perda de umidade e invasão por agentes infecciosos e/ou de substâncias tóxicas. Dentre as diversas doenças que podem acometer a pele, destaca-se a Hanseníase, doença infecciosa, granulomatosa, debilitante, mas tratável, causada por *Mycobacterium leprae* que atinge principalmente nervos periféricos. O exame histopatológico é usado para o diagnóstico da Hanseníase. Os espécimes retirados por meio de biópsia são fixados e incluídos em parafina e, depois de realizados os cortes histológicos, esses blocos são arquivados. Estes arquivos, classificados como “biobancos”, são fontes ricas para pesquisas relacionadas às áreas biomédicas. Existem poucos estudos sobre a diversidade bacteriana da pele lesionada de indivíduos com Hanseníase, tanto para bactérias cultiváveis como, principalmente, não cultiváveis. Este estudo investigou a diversidade de bactérias presentes em cortes histológicos de pele lesionada de indivíduo com diagnóstico de Hanseníase lepromatosa virchowiana, por meio de uma abordagem independente de cultivo. Assim, o DNA total do bloco de parafina foi extraído. O amplicon do gene de rRNA 16S de bactérias foi usado para a construção de biblioteca de clones. A análise filogenética revelou uma diversidade moderada, mas complexa, detectando 27 OTUs (*operational taxonomic unity*) que foram afiliadas a quatro filos: Proteobacteria (48%), Firmicutes (41%), Bacteroidetes (4%) e Actinobacteria (7%). Estudos sobre diversidade bacteriana da pele de indivíduos saudáveis revelam a predominância destes mesmos filos, embora com distribuição distinta. Destaca-se que o gênero *Propionibacterium* (Actinobacteria), bactéria indígena da pele sadia, foi drasticamente reduzido na pele lesionada de indivíduo com Hanseníase. Este é

o primeiro estudo da diversidade bacteriana da pele lesionada de indivíduo com Hanseníase, apontando mudança significativa na abundância dos filos predominantes da pele normal, bem como alteração na composição de táxons indígenas, como gênero. Os dados obtidos são essenciais para detectar diferenças da microbiota bacteriana associada a esta doença.

Abstract

The skin is a critical barrier for the survival by preventing moisture loss and invasion by infectious agents and/or toxic substances. Among the various diseases that can affect the skin, there is leprosy, infectious disease, granulomatous, debilitating, but treatable, caused by *Mycobacterium leprae* which mainly affects the peripheral nerves. Histopathology is used for the diagnosis of leprosy. Specimens removed by biopsy are fixed and embedded in paraffin, and after performed histological sections, these blocks are filed. These files, classified as "biobanks", are rich sources for research related to biomedical areas. There are few studies on the bacterial diversity of skin lesions of patients with leprosy for both culturable bacteria as mostly unculturable. This study investigated the diversity of bacteria present in histological lesional skin of individual diagnosed with lepromatous leprosy, through a culture-independent approach. Thus, total DNA was extracted from paraffin block. The amplicon of the 16S rRNA gene of bacteria was used for the construction of library clones. Phylogenetic analysis revealed a moderate diversity, but complex, detecting OTUs 27 (operational taxonomic unity) that were affiliated with four phyla: Proteobacteria (48%), Firmicutes (41%), Bacteroidetes (4%) and Actinobacteria (7%). Studies on bacterial diversity of the skin of healthy individuals revealed the predominance of these same phyla, although with different distribution. It is noteworthy that genus *Propionibacterium* (Actinobacteria), indigenous bacteria of healthy skin, was drastically reduced in lesional skin of individuals with leprosy. This is the first study of bacterial diversity in lesional skin of individual with leprosy, indicating significant change in the abundance of dominant phyla of normal skin, as well as changes in the composition of indigenous taxa, such

as genus. The data obtained are essential to detect differences of bacterial microbiota associated with this disease.

1- Introdução

1.1 – Pele

A pele humana é o maior órgão multifuncional e complexo do corpo constituída por duas camadas de tecido epitelial, a epiderme e a derme, além de estruturas como pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas dentre outras. A pele regula interações celulares e moleculares essenciais em resposta ao ambiente (Firooz, 2011) (Figura 1), sendo também uma barreira crítica para a sobrevivência. Dentre as suas várias funções está a prevenção da perda de umidade e invasão por agentes infecciosos e/ou de substâncias tóxicas. Além disso, ela protege contra raios ultravioletas (UV) e controla a passagem de água e eletrólitos, tendo importante papel na regulação térmica do corpo, além das funções sensoriais e imunológicas (Firooz, 2011). Durante o processo de nascimento e subsequente exposição do neonato ao ambiente, a pele é colonizada por uma grande variedade de micro-organismos, muitos dos quais são comensais ou simbióticos (Grice *et al.*, 2008).



Figura 1: Camadas e estruturas da pele. Fonte: Grice *et al.*, 2008 (adaptado)

A pele apresenta uma variedade de *habitats*, incluindo regiões com uma ampla faixa de pH, temperatura, umidade e conteúdo seboso. Além disso, estruturas da pele como os folículos capilares, sebáceos, glândulas écrinas e apócrinas compreendem *sub-habitats* que podem estar associados com sua microbiota residente (Grice *et al.*, 2008). Portanto, a pele representa um *habitat* complexo para diversas populações de micro-organismos que colonizam nichos fisiológicos e topologicamente distintos (Figura 2). Um exemplo destes muitos nichos são as axilas que representam regiões úmidas distantes poucos centímetros do antebraço, que é uma região seca (Grice *et al.*, 2009). Os micro-organismos encontrados na pele vivem de forma comensal em sua superfície, sendo muitos exclusivos deste ambiente (Roth, 1988). A investigação da diversidade microbiana de sítios específicos pode revelar pequenas diferenças entre a pele saudável e de doente (Grice *et al.*, 2009).

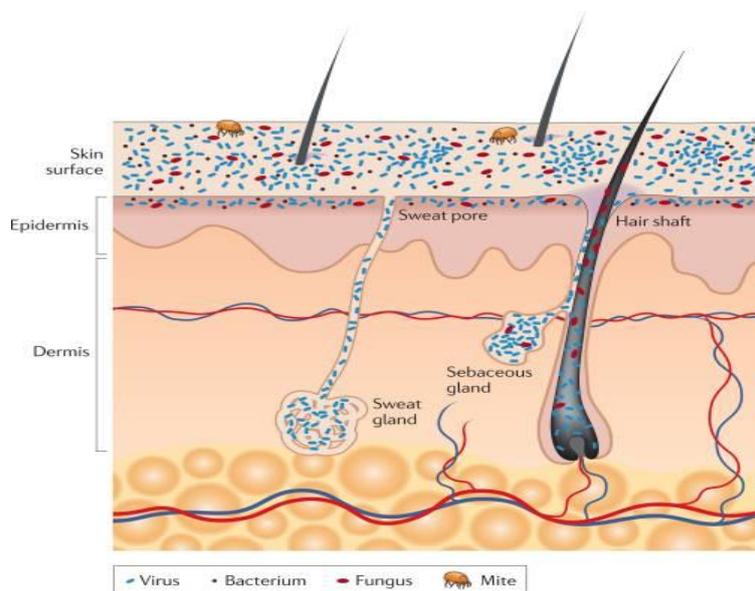


Figura 2: Representação esquemática da histologia da pele, em secção transversal, mostrando micro-organismos e anexos da pele. Fonte: Grice *et al.*, (2011)

Grice e colaboradores (2009) investigaram a diversidade topográfica e temporal do microbioma da pele humana, constatando a presença de dezenove filos bacterianos na pele de indivíduos saudáveis, sendo que os filos mais abundantes foram: Actinobacteria (51,8%), Firmicutes (24,4%), Proteobacteria (16,5%) e Bacteroidetes (6,3%); sendo os gêneros mais abundantes: *Corynebacterium* (22,8%, Actinobacteria), *Propionibacterium* (23%, Actinobacteria) e *Staphylococcus* (16,8%, Firmicutes). Este estudo foi realizado em 10 indivíduos saudáveis de sítios diferentes da pele classificados como sebáceo, seco e úmido. As regiões do corpo humano contempladas neste estudo estão apresentadas na Figura 3.

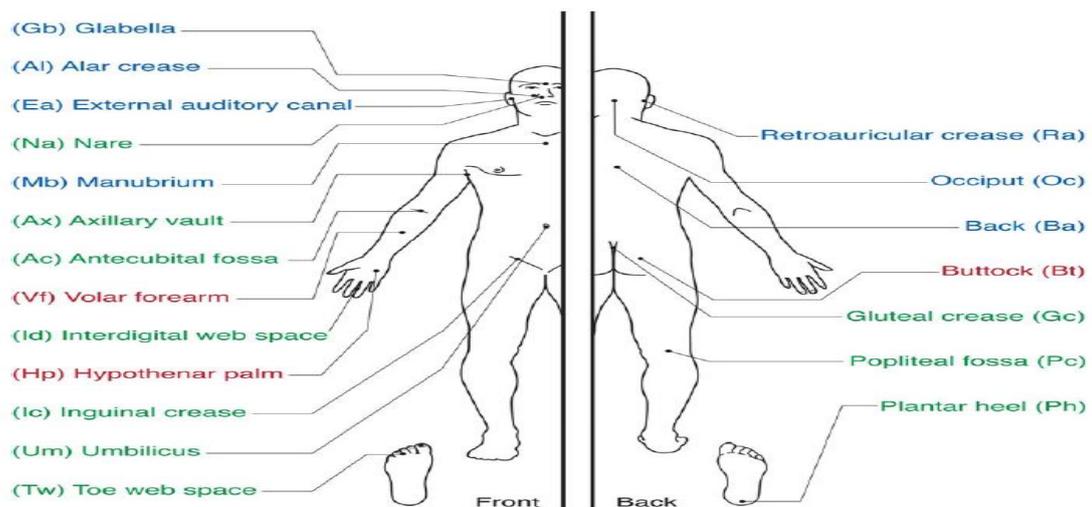


Figura 3: Vinte sítios selecionados e sua localização no corpo humano. Os sítios representam três micro-ambientes: sebáceo (azul), seco (vermelho) e úmido (verde).
Fonte: Grice *et al.*, 2009 (Supporting Online Material).

Este estudo contribuiu para o conhecimento da variação do perfil microbiano da pele normal, nas relações intra e interpessoais, temporal e topográfica. Além disso, o conhecimento da microbiota da pele sadia é de importância nas doenças dermatológicas, uma vez que a microbiota residente

pode tornar-se patogênica em resposta a danos na barreira da pele (Grice *et al.*, 2008 e 2009)

Dekio e colaboradores (2007), usando abordagem dependente de cultivo e sequência do gene de rRNA 16S, caracterizou a microbiota da pele de 13 pacientes com dermatite atópica e 10 indivíduos saudáveis. Neste estudo, *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus sp* foram isoladas de todos os indivíduos controles. Por outro lado, quatro pacientes com dermatite atópica não abrigaram *Propionibacterium acnes* (4/13) e o *Staphylococcus sp* foi isolado de uma amostra (1/13). Além disso, nenhum paciente apresentou isolados de *Staphylococcus aureus*, sendo todos os *Staphylococcus sp* isolados coagulases negativos. Observou-se, também, que cinco pacientes com dermatite atópica apresentaram *Stenotrophomonas maltophilia* que não foi encontrada em nenhum indivíduo controle. Estes resultados sugerem que pacientes acometidos por dermatite atópica apresentam uma mudança do perfil bacteriano da pele em relação a indivíduos saudáveis (Dekio *et al.*, 2007).

Algumas doenças dermatológicas manifestam-se em regiões características da pele, como psoríase, na parte exterior do cotovelo, e dermatite atópica, que se manifesta com maior frequência no interior da curva do cotovelo. Além disso, exposição a antibióticos, variações nas práticas de higiene e mudanças no estilo de vida têm o potencial de mudar o microbioma da pele, intensificando as chances de doenças, como dermatite atópica, dentre outras (Grice *et al.*, 2008 e 2009; Kong *et al.*, 2012).

Muitos estudos sugerem um papel específico de bactérias nas doenças de pele não infecciosas, como dermatite atópica, rosácea, psoríase e acne

(Grice *et al.*, 2008). A pele humana é considerada um ecossistema complexo, com uma microbiota transitória e outra residente. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium* e *Acinetobacter*, dentre outras bactérias cultiváveis, colonizam normalmente a pele sadia. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* podem ser colonizadores transitórios, especialmente em condições patológicas. Fatores ambientais, como temperatura, umidade e exposição à luz, e do hospedeiro, incluindo gênero, idade, genótipo, estado imunológico e uso de cosméticos, podem afetar o tamanho da população e estrutura da comunidade bacteriana. A doença pode ser consequência de alterações microecológicas da pele (Gao *et al.*, 2007). Além disso, algumas bactérias não cultiváveis, como o *Mycobacterium leprae*, podem também colonizar a pele causando a doença Hanseníase.

1.2-*Mycobacterium leprae*

Em 1873, Armaeur Hansen descobriu o bacilo Gram-positivo da lepra em biópsia de pele humana (Figura 4), sendo este o primeiro patógeno bacteriano a ser identificado como causa de uma doença infecciosa humana. Entretanto, sua tentativa de cultivar o *Mycobacterim Leprae* (*M.leprae*) *in vitro* foi frustrada, como ocorre até os dias atuais (Cole *et al.*, 2001; Martins, 2008). Uma característica do *M. leprae* é seu tropismo por células de *Schwann*, que representa a base de grave neuropatia que podem levar à perda senso-motora,

responsável pela maioria das deformidades e incapacidades físicas associadas à Hanseníase (Grossi, 2003).



Figura 4: *Mycobacterium leprae* em processo de divisão celular – microscopia eletrônica de varredura. Fonte: HANSEN.

O genoma completo do *M. leprae* contém aproximadamente 3,3 Mb e 8% de conteúdo G+C. Apenas 49,5% do seu genoma contém genes codificadores de proteínas, enquanto que 27% contém pseudogenes. O genoma remanescente, 23,5%, deve corresponder a sequências regulatórias (Cole *et al.*, 2001) (Figura 5). Esses valores são menores do que os registrados para o genoma de *M. tuberculosis*, que possui 4,4 Mb, com aproximadamente 4.000 genes, exceto 6% de conteúdo G+C. Considerando que o genoma de *M. leprae* é topologicamente equivalente e de tamanho relativamente menor que outras micobactérias (~4,4 Mb), é provável que uma extensiva redução e rearranjo deve ter ocorrido durante a evolução. Se todos os genes do genoma de *M. leprae* fossem ativos, seriam esperadas cerca de 3.000 proteínas quando comparadas com as 4.000 preditas para *M. tuberculosis*, indicando que os pseudogenes são inertes. Além disso, a partir da divergência do último ancestral comum micobacteriano, o bacilo da lepra pode ter perdido mais do que 2.000 genes (Cole *et al.*, 2001).

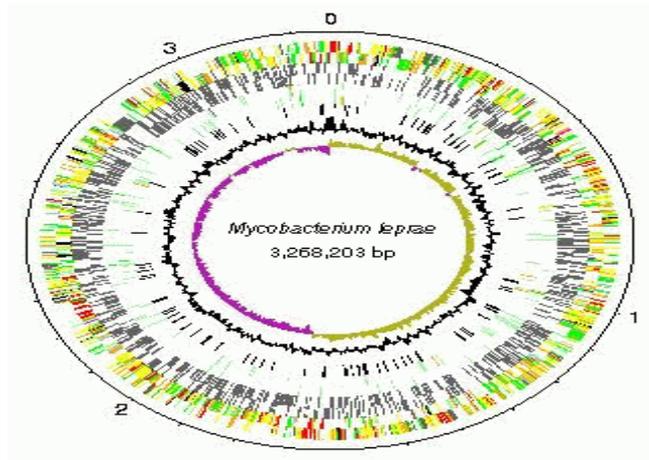


Figura 5: Representação do genoma do *Mycobacterium leprae*.
 Fonte: Cole *et al.*, 2001.

1.3- Hanseníase

Dentre as diversas doenças que podem acometer a pele e nervos periféricos, destaca-se a Hanseníase que é uma doença infecciosa, granulomatosa, debilitante, mas tratável, causada pelo agente *M. leprae* (Figura 6). Apesar da concepção popular de Hanseníase estar associada primariamente a imagens vindas da Bíblia ou dos tempos medievais e tenha levado a vários estigmas sociais e grande sofrimento devido à aparência deformada dos indivíduos infectados, 250 milhões de indivíduos no mundo estavam acometidos desta doença em 2007, principalmente nas regiões rurais de Bangladesh (Pena, 2012; Grossi, 2003).



Figura 6: Pele de indivíduos com Hanseníase. Fonte: SAVK

A Hanseníase chegou ao Brasil com os primeiros colonizadores portugueses, principalmente açorianos, e para sua disseminação contribuíram os escravos africanos. Entretanto, outros povos posteriormente contribuíram para a sua disseminação. Assim, no sul do país foram encontrados doentes de Hanseníase provenientes de Portugal, Espanha, França, Rússia e Países Balcânicos. A Hanseníase disseminou-se por vários pontos do litoral, sendo interessante notar que alguns focos se ampliaram, enquanto outros se reduziram e alguns até mesmo desapareceram (Ministério da Saúde, 1960).

As primeiras providências com relação ao “Mal de HANSEN” foram tomadas no Recife, em 1714, com a fundação de um asilo para doentes de Hanseníase, pelo Padre Antonio Manoel pioneiro da campanha no Brasil. Esse asilo deu origem ao Hospital de Lázaros em 1789 que funcionou até 1941 sob a administração da Santa Casa. A Bahia foi um dos grandes focos no passado. Em 1789 calculava-se que havia cerca de 3.000 hansênicos (Ministério da Saúde, 1960).

A fonte primária de transmissão da Hanseníase é de ser humano para ser humano. A família tem sido colocada como uma possível fonte de propagação da doença e especial atenção tem sido dada aos familiares de hansênicos por possuírem similaridades genéticas e terem contato íntimo prolongado, especialmente entre cônjuges (Joyce, 2012). Em 1981, a Organização Mundial de Saúde (OMS) determinou que o tratamento da Hanseníase fosse realizado com uma terapia multi-droga (MDT), resultando na redução da prevalência da doença para menos de um caso por 10.000 pessoas. Em 90% dos países onde a Hanseníase era considerada um problema de saúde pública os números ficaram abaixo do limiar apresentado

.Como resultado do uso de MDT mais de 11 milhões de pessoas com Hanseníase foram curadas, muitas delas sem sequelas (Britton *et al.*, 2004).

A Hanseníase pode apresentar formas clínicas diferentes que podem variar entre: indeterminada, tuberculóide, dimorfa ou virchowiana (Quadro 1). No presente trabalho foi abordada somente a forma clínica virchowiana por ser esta a que apresenta maior presença de bacilos *Mycobacterium leprae*.

Quadro1: Sinopse da classificação das formas clínicas da Hanseníase

Características			
Clínicas	Baciloscópicas	Formas Clínicas	Classificação
Áreas de hipo ou anestésias, parestesias, manchas hipocrômicas e /ou eritemohipocrômicas, com ou sem diminuição da sudorese e rarefação de pêlos.	Negativa	Indeterminada	Paucibacilar
Placas eritematosas, eritemato-hipocrômicas, até 5 lesões de pele bem delimitadas, hipo ou anestésicas , podendo ocorrer comprometimento de nervos.	Negativa	Tuberculóide	
Lesões pré-foveolares (eritematopigmentares de tonalidade ferruginosa ou pardacenta), apresentando alterações de sensibilidade.	Positiva (bacilos e globais ou com raros bacilos) ou negativa	Dimorfa	Mutibacilar Mais de 5 lesões.
Eritema e infiltração difusos, placas eritematosas de pele, infiltradas e de bordas mal definidas, tubérculos e nódulos, madarose, lesões das mucosas, com alteração de sensibilidade.	Positiva (bacilos abundantes e globais)	Virchowiana	

Fonte: PORTAL DA SAÚDE (adaptado)

1.4- Distribuição mundial da Hanseníase

Inicialmente, a Hanseníase era amplamente distribuída na Europa e Ásia, mas atualmente ocorre, principalmente, em países pobres de regiões

temperadas e tropicais. Entretanto, há registros em países desenvolvidos de pessoas que desenvolveram a doença depois de terem vivido em regiões endêmicas. Em 2011, foram diagnosticados pelo Ministério da Saúde (MS) 30.298 novos casos de Hanseníase no Brasil e nos últimos levantamentos realizados pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) foram encontrados os seguintes dados para as Américas: (Tabela 1) (Pena, 2012).

Tabela 1: Prevalência e detecção da Hanseníase nas Américas.

Países	Taxa de prevalência para 10.000 habitantes			Taxa de casos detectados para 100.000 habitantes		
	2000	2005	2010	1999	2004	2009
Bolívia	0.1	0.1	---	0.9	1.1	1.4
México	0.2	0.1	0.0	0.1	0.3	0.1
Paraguai	1.2	1.1	0.5	6.7	8.2	6.3
Equador	0.2	0.1	0.1	0.6	1.1	0.6
Cuba	0.5	0.2	0.2	3	1.9	2.3
Brasil	4.3	1.7	1.9	25.9	26.9	19.2
Argentina	0.5	0.2	0.2	1.3	1	0.8
República Dominicana	0.4	0.4	0.3	2.7	2.2	1.7
Venezuela	0.6	0.5	0.6	3.3	2.6	2.0
Colômbia	0.8	0.3	0.2	1.7	1.2	1.0
Suriname	2.3	0.7	0.5	14.6	10.8	7.2
Costa Rica	0.4	0.0	0.1	0.4	0.2	0.2
Peru	0.1	---	0.0	0.3	---	0.1
Antilhas Holandesas	---	---	0.0	---	---	0.0
Antígua e Barbuda	---	---	0.0	---	---	0.0
Bahamas	---	---	0.0	---	---	0.0
Barbados	---	---	0.0	---	---	0.0
Belize	---	---	0.0	---	---	0.0
Ilhas Britânicas	---	---	0.0	---	---	0.0
Chile	---	0.0	0.0	---	0	0.0
Dominica	---	---	0.1	---	---	1.4
El Salvador	---	0.1	0.0	---	0.1	0.1
Granada	---	---	0.2	---	---	0.0
Guatemala	---	0.0	0.0	---	0	0.0
Guiana	---	1.3	0.8	---	4.9	3.8
Honduras	---	0.0	0.0	---	0	0.0
Jamaica	---	0.1	0.0	---	0.3	0.3
Montserrat	---	---	0.0	---	---	0.0
Nicarágua	---	---	0.0	---	---	0.1
Panamá	---	0.0	0.0	---	0.1	0.0
São Cristovão	---	---	0.0	---	---	0.0
Santa Lúcia	---	0.9	0.3	---	8.2	4.6
São Vicente e Granadinas	---	---	0.0	---	---	0.0
Trinidade e Tobago	---	0.4	0.3	---	1.8	1.9
Uruguai	---	---	0.0	---	---	0.2
Estados Unidos da América	---	0.0	0.0	---	0	0.0

Fonte: Penna, 2012 (adaptado)

1.5- Diversidade microbiana e o gene de rRNA 16S

A microbiota conhecida da pele considerava apenas àqueles micro-organismos que podiam ser cultivados. Entretanto, atualmente estima-se que menos de 1% das espécies bacterianas sejam cultiváveis em laboratório (Staley & Konopka, 1985). Neste cenário, alguns pesquisadores iniciaram a investigação da diversidade microbiana humana por meio de grandes projetos como o *Human Microbiome Project* (HMP) (<http://commonfund.nih.gov/hmp/>).

Visando maior compreensão da microbiota da pele, o “*National Institute of Health*” tem como objetivo a caracterização da microbiota humana por meio da análise das funções e da associação da microbiota à condição do indivíduo doente ou sadio (<http://commonfund.nih.gov/hmp/>). A pesquisa da diversidade microbiana humana tem utilizado técnicas moleculares baseadas no gene de rRNA 16S. Em um estudo pioneiro realizado por Gao e colaboradores (2008), usando o gene de rRNA 16S, revelou que as bactérias presentes no antebraço coletadas por *swab* apresentaram alta diversidade – uma evidência de que a pele é um ambiente rico em diversidade microbiana. Além disso, seus achados sugerem baixa similaridade da microbiota entre os indivíduos, sendo extremamente dinâmica variando em curto espaço e tempo no mesmo indivíduo (Gao *et al.*, 2008).

Os genes de rRNA são amplamente usados para estimar a história evolutiva e taxonômica dos organismos. A escolha dos genes de rRNA como ferramentas para atingir estes objetivos é baseada na grande conservação do rRNA. Os genes de rRNA são componentes essenciais do ribossomo, que

consiste em mais de 50 proteínas e três classes de moléculas de rRNA; uma estrutura precisa é essencial para a montagem de ribossomos funcionais, restringindo mudanças drásticas dos genes de rRNA. Nas bactérias, os três genes (5S, 16S e 23S) são organizados em um operon, podendo estar presente em múltiplas cópias (1 a 15) no genoma. Contudo, diferenças significativas entre as cópias de genes de rRNA, embora pouco frequente, podem ser encontradas em um mesmo organismo, dos três domínios da vida e nas três classes de genes de rRNA (Pei *et al.*, 2010).

A evolução divergente entre os genes de rRNA em alguns genomas pode perturbar o registro da história evolutiva e obscurecer a real identidade de um organismo. Uma variação substancial pode levar a classificação de um organismo em mais de uma espécie. Para organismos cultiváveis, este problema pode ser resolvido pela clonagem dos genes de rRNA de uma cultura pura do organismo para identificar o grau de variação. Contudo, pesquisas de amostras ambientais, como recentemente iniciado pelo *HMP*, empregam a abordagem-independente de cultivo para explorar microbiomas constituídos por diversidade complexa de espécies (Pei *et al.*, 2010).

1.6- O operon de RNA ribossômico

Em 1987, Woese propôs o uso da sequência dos genes de RNA ribossômico, como um marcador com dimensão taxonômica para identificação de bactérias. Existem boas razões para que o rRNA seja considerado um marcador molecular adequado e confiável para análises filogenéticas: são

universalmente distribuídos, apresentam funcionalidade constante, regiões altamente conservadas entre espécies distantes e ser menos afetado pela transferência gênica horizontal (Woese, 1987; Rosselló-Mora *et al.*, 2001; Nascimento, 2011).

Em bactérias, o loco *rnn* (rRNA) contém os genes codificando os rRNAs 16S (*rrs*), 23S (*rrl*) e 5S (*rrf*), normalmente nesta ordem. Esses genes apresentam tamanhos de aproximadamente 1.650, 3.000 e 120 pb, respectivamente, e são tipicamente organizados em um operon em bactérias (Figura 7). O número de operons de rRNA por genoma bacteriano varia de 1 a 15 cópias (Gürtler & Stanisich, 1996). O uso de sequências do gene de rRNA 16S para a classificação de bactérias tornou-se popular dentre os taxonomistas bacterianos. O rRNA 16S é o mais amplamente usado e ideal para estudos filogenéticos por possuir tamanho adequado (aproximadamente 1.650 pb), presença de regiões conservadas e variáveis, e a grande disponibilidade de sequências nos bancos de dados. Desde a década de 1980, milhares de sequências do gene de rRNA 16S têm sido depositadas em bancos de dados como Ribosomal Database Project (RDP II), ARB-Silva (Pruesse *et al.*, 2007) e GenBank, com mais de 2.639.157, 3.672.787 e 162.886.727 sequências do do gene de rRNA 16S, respectivamente, depositadas até o presente momento (acessado em março de 2013).

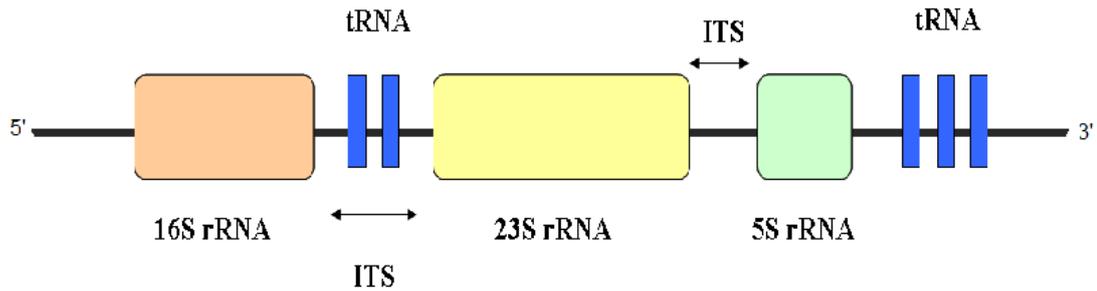


Figura 7. Representação esquemática do operon de RNA ribossômico de procariotos.

O advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis em 1987, em conjunto com a técnica de sequenciamento de DNA desenvolvido anteriormente por Frederick Sanger (1977) permitiu que Woese e colaboradores, em 1987, distinguissem 12 filos do domínio *Bacteria*, por meio de métodos baseados no cultivo bacteriano e no uso do marcador filogenético rRNA 16S. Os filos identificados foram: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Chlamydiae, Planctomycetes, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Spirochaetes, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus e Thermotogae. Desde 1987, outros 14 filos foram descobertos e caracterizados por meio de técnicas dependentes de cultivo (Rappé & Giovannoni, 2003). Com o avanço da microbiologia ambiental por meio do sequenciamento do gene de rRNA 16S, foi possível identificar mais 26 novos filos sem representantes cultivados (Hugenholtz *et al.*, 1998; Handelsman, 2004).

1.7- Histopatologia e os “Biobancos”

A histologia é uma técnica clássica usada para o estudo morfológico das células e estruturas subcelulares, através de cortes da amostra em seções

finas. A histotécnica é uma importante ferramenta para a compreensão do desenvolvimento dos tecidos e possíveis lesões (ABRALAPAC, 2013).

Rotineiramente, amostras de tecidos são coletadas do corpo humano para análise visando diagnóstico de doenças, sendo o fragmento destes materiais fixados com formol, incluído em parafina e armazenado nos laboratórios. Esses espécimes representam importante fonte de material biológico para pesquisa (Simonato *et al.*, 2007) (Figura 8). Os arquivos histológicos de blocos de parafina podem ser considerados “biobancos”. Os materiais de arquivo são constituídos basicamente de tecidos congelados ou fixados e incluídos em parafina. Os blocos de parafina podem conter desde materiais muito pequenos, como fragmentos gástricos, a fragmentos maiores, como tecidos de útero, ovário, coração e cérebro, dentre outros (Borea *et al.*, 2004).

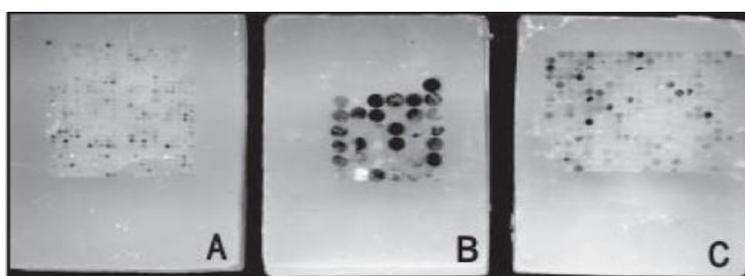


Figura 8: Fragmentos de tecido humano incluídos em parafina. Fonte: Andrade, 2007.

A amplificação de amostras de DNA por PCR é uma ferramenta poderosa para estudos de tecidos humanos fixados e posteriormente incluídos em parafina e outros materiais oriundos de “biobancos”. No entanto, nem todos os métodos de preservação e fixação de tecidos humanos frescos são adequados para subsequente extração de DNA (Greer *et al.*, 1991).

1.8- Justificativa

Considerando a ausência de estudos sobre a diversidade bacteriana da pele de indivíduos com diagnóstico prévio de Hanseníase para bactérias cultiváveis e não-cultiváveis, torna-se relevante pesquisar, analisar e classificar taxonomicamente bactérias presentes nos cortes histológicos destes pacientes, ampliando os conhecimentos sobre a diversidade bacteriana da pele desses indivíduos.

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Investigar a diversidade de bactérias presentes em cortes histológicos de pele lesionada de pacientes com diagnóstico prévio de Hanseníase.

2.2- Objetivos Específicos

2.1.2 Obter e analisar, por método independente de cultivo, sequências do gene de rRNA 16S de amostras de tecido de pele lesionada parafinadas.

2.1.3 Identificar e classificar taxonomicamente as bactérias presentes nos cortes histológicos.

3 - Materiais e Métodos

3.1- Amostragem

Cortes histológicos de pele lesionada, de 20 indivíduos com diagnóstico prévio de Hanseníase, arquivados em blocos de parafina cedidos pelo laboratório de análises clínicas particular (Hermes Pardini), foram usados para investigar a diversidade de bactérias por abordagem molecular. A pesquisa foi realizada de acordo com parecer 231 da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) (anexo 1) e aprovada pelo Conselho de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP – UFMG). Os documentos encontram-se em anexo (anexo 2)

3.2- Preparo e desparafinação dos tecidos de pele embebidos em parafina para extração de DNA

Os blocos de parafina contendo amostras de tecido de pele foram desbastados com o auxílio de um bisturi, obtendo em média cinco fatias finas de parafina (de aproximadamente 5 µm), que foram colocadas em um tubo Eppendorf. A seguir são descritas as etapas para a desparafinação das amostras:

- A) Adicionar 1ml de xilol aquecido a 65°C sobre os cortes de parafina e manter por 10 minutos a 65°C no termobloco.
- B) Centrifugar a 16000 x g por 5 minutos.
- C) Desprezar o sobrenadante com auxílio de uma ponteira.

- D) Repetir os passos de B a C para remoção completa da parafina.
- E) Adicionar 500 µl de etanol absoluto, homogeneizar por inversão a 22 °C.
- F) Centrifugar a 16000 x g por 5 minutos.
- G) Descartar o sobrenadante com auxílio de uma ponteira.
- H) Adicionar 500L µl de etanol 95%. Homogeneizar por inversão, centrifugar a 16000 x g e retirar o sobrenadante.

Após a desparafinação, a extração de DNA foi realizada utilizando o Wizard Genomic DNA Purifications Kit (Promega Corporation – Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. Nas amostras que apresentaram uma concentração baixa de DNA (<20 ng/µL), foi utilizado o “Ilustra Genophi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare – Reino Unido)” de acordo com as instruções do fabricante para aumentar a concentração de DNA.

3.3. - Amplificação do gene de rRNA 16S das amostras de DNA parafinado

Fragmentos dos genes de rRNA 16S foram amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR) usando os pares de oligonucleotídeos iniciadores 8f (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') e 907r (5'TACGGHTACCTTGTTACGACTT 3') (Lane, 1991), gerando um amplicon de 899 pb. Cada reação de PCR continha 40 ng de DNA molde, tampão para PCR, 0,5 µM de cada um dos iniciadores, 0,4 mM de dNTP e 1 U de DreamTaq polimerase (Fermentas- Canadá), resultando em um volume total de 20 µL. As condições para amplificação do gene de rRNA 16S de bactéria estão no quadro 2. A PCR foi conduzida em um termociclador (PTC -100' *Programable Thermal*

Controller). Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 g/ml).

Quadro 2: Condições da PCR para amplificação do gene de rRNA 16S de bactérias.

	Etapas	Temperatura	Tempo
	Desnaturação Inicial	95°C	5 minutos
Ciclo repetido 18 vezes	Desnaturação	94°C	1 minuto
	Anelamento dos iniciadores	55°C a 47°C*	1 minuto
	Extensão	72°C	3 minutos
	Extensão Final	72°C	10 minutos

*A temperatura cai 1° C a cada dois ciclos (uma repetição por temperatura)

3.3.1- Recondicionamento das amostras

As amostras de DNA que não foram satisfatoriamente amplificadas foram submetidas à reamplificação. Para isto, o produto desta primeira PCR foi submetido a uma nova reação de PCR na qual a concentração de DNA consistia em 10% do volume final da mistura para a segunda PCR exceto o número de ciclos (cinco), temperatura de anelamento (55°C) e extensão final, conforme se segue: 95°C por 5 minutos, 5 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 3 minutos a 72°C e extensão final a 72°C por 1 hora. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) e eluídos do gel utilizando-se o kit DNA Extraction Kit (Fermentas, Canadá), de acordo com instruções do fabricante.

3.4- Construção de bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S

3.4.1 Clonagem do gene de rRNA 16S e transformação da bactéria eletrocompetente *Escherichia coli* XL Blue

Os amplicons purificados do gene de rRNA 16S foram clonados no vetor pJET1.2/blunt Cloning Vector utilizando o CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Canadá), de acordo com as instruções do fabricante. A bactéria *Escherichia coli* XL1 Blue eletrocompetente foi transformada e semeada em placas contendo meio LB (Luria-Bertani – 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% NaCl, pH 7,0), suplementado com ampicilina (100 µg/ml), as quais foram incubadas a 37°C, por 18 horas. As colônias contendo os plasmídios com os insertos foram selecionadas através da resistência à ampicilina. Essas colônias foram transferidas, com palitos esterilizados, para microplacas com 96 poços contendo 300 µl de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg /mL) e glicerol (25% v/v), incubadas a 37°C por 24 horas e estocadas a -80°C.

3.4.2- Sequenciamento do gene de rRNA 16S e análise filogenética

Os insertos de rDNA 16S foram sequenciados bidirecionalmente usando iniciadores específicos do vetor pJET1.2 forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') e pJET1.2 reverse (5'-

AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') As reações de sequenciamento continham 150 ng do DNA, DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit e 0,5 µM de cada um dos iniciadores resultando em 10 µL do volume total. A reação foi colocada em um termociclador utilizando um programa com os seguintes passos: desnaturação por 2 segundos a 95°C, avançando para 35 ciclos de desnaturação por 25 segundos a 95°C, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão por 3 minutos a 60°C. Os produtos foram sequenciados no sequenciador automático "Mega BACE 1000 DNA Analysis System". As sequências parciais foram checadas para a qualidade, alinhadas e editadas para a produção de um consenso usando os programas Phred v.0.020425 (Erwing & Green, 1998), Phrap v.0.990319 (Green, 1994) e Consed 12.0 (Gordon *et al.*, 1998). As sequências foram comparadas com os bancos de dados disponíveis, usando-se as ferramentas de pesquisa do GenBank BLASTN e RDP Seqmatch para determinar as afiliações filogenéticas. O programa Bellerophon foi usado para detectar e retirar as sequências quiméricas (Huber *et al.* 1994).

As OTUs (Unidade Taxonômica Operacional) foram definidas a partir do programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005), considerando o nível de distância genética de 3%, uma vez que níveis $\geq 97\%$ de similaridade entre sequências têm sido proposto para classificar bactéria no nível de espécie (Drancourt *et al.*, 2000). A cobertura das bibliotecas foi calculada usando-se a equação $C = 1 - (n/N) \times 100$, onde n significa o número de OTUs e N o número de seqüências analisadas na biblioteca (Good, 1953). As relações filogenéticas foram inferidas utilizando-se o programa ARB- Silva (Pruesse *et al.*, 2007) usando-se o método neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987).

Para avaliar a riqueza da comunidade bacteriana presente nos cortes histológicos de pele de indivíduos com hanseníase foram utilizados os índices de diversidade (Hill *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2001). Os índices de diversidade de Shannon-Weaver e Simpson avaliam a diversidade dos clones, sendo que o primeiro é determinado pela riqueza das OTUs detectadas e o segundo é influenciado pela abundância da OTU mais comum na amostra (Hughes *et al.*, 2001).

4– Resultados e Discussão

Desde o início da microbiologia até quase o fim do século XX a diversidade, identificação e taxonomia bacteriana eram dependentes de técnicas clássicas de cultivo. Entretanto, nos últimos 30 anos o desenvolvimento das áreas de biologia molecular e bioinformática promoveu grandes transformações na taxonomia bacteriana e no conhecimento da diversidade. Atualmente, a tecnologia disponível e o enorme número de sequências do gene de rRNA 16S depositadas em bancos de dados permitem explorar a composição da microbiota nos mais diversos ecossistemas, ampliando o conhecimento da diversidade bacteriana. A caracterização da microbiota da pele baseada em cultivo é tendenciosa, pois favorece as espécies de crescimento mais rápido sob condições laboratoriais, como, por exemplo, *Staphylococcus* spp. (Grice *et al.*, 2009). Portanto, investigar a diversidade bacteriana em amostras difíceis de isolar e cultivar, como a pele humana, é essencial a utilização de técnicas independentes de cultivo para uma visão ampla da comunidade bacteriana presente na amostra.

Apesar dos recentes esforços para caracterização da diversidade microbiana da pele por abordagem molecular independente de cultivo, como, por exemplo, o “Human Microbiome Project” (HMP), pouco se conhece sobre a diversidade bacteriana da pele de indivíduos acometidos por hanseníase. Alguns estudos sobre o microbioma da pele de indivíduos portadores de doenças dermatológicas, como a dermatite atópica (Dekio, 2007), demonstram uma significativa mudança na comunidade microbiana da pele destes indivíduos, quando comparadas com indivíduos saudáveis. Em concordância, o presente estudo revela mudanças significativas da microbiota bacteriana da

pele de indivíduos com hanseníase, quando comparados com indivíduos saudáveis.

4.1- Amplificação do gene de rRNA 16S de bactéria

Técnicas independentes de cultivo são adequadas para o estudo da microbiota da pele humana de indivíduos com hanseníase, superando as dificuldades de cultivo, uma vez que menos de 1% das bactérias é cultivável nas condições clássicas de laboratório. Neste estudo, a quantidade de DNA extraído diretamente dos cortes de blocos de parafina foi, geralmente, menor do que 10 ng/μL. Assim, para aumentar a quantidade de DNA utilizou-se o “Illustra Genophi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare – Reino Unido)”, antes da amplificação do gene de rRNA 16S. Tentou-se a amplificação do gene de rRNA 16S de 20 amostras de DNA extraído da lesão de pele parafinada de diferentes indivíduos com Hanseníase. Entretanto, não foram obtidos amplicons de todas as amostras testadas (Figura 9 A e B). Em algumas delas a quantidade de DNA dos amplicons foi insuficiente para a construção da biblioteca de clones do gene de rRNA 16S. Diversas tentativas de reamplificação dessas amostras não surtiram efeito positivo. Considerando que a reação de amplificação do gene de rRNA 16S usada é bem padronizada, estes dados sugerem a presença de inibidor para a reação de PCR.

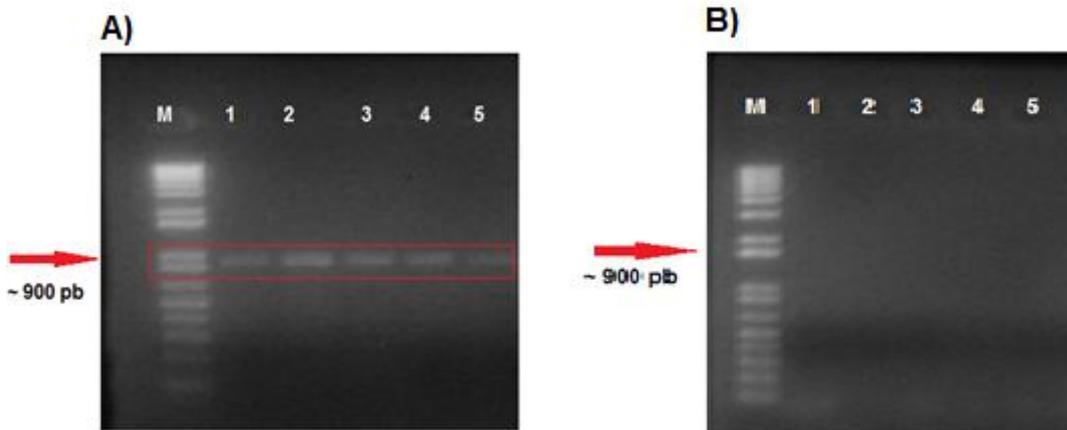


Figura 9: Gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio a 0,5% contendo: (A) amplicons do gene de rRNA 16S (1 a 5) e (B) ausência de amplicons do gene de rRNA 16S (1 a 5) das amostras de lesão de pele parafinadas de indivíduos com Hanseníase. M, marcador de peso molecular 1 Kb (M) (Invitrogen- Estados unidos da América).

Deve-se ressaltar que o tecido a ser incluído em parafina é submetido a várias etapas: fixação do tecido fresco em formalina (formol 37%), processamento do tecido em diferentes banhos químicos, como em álcool absoluto, acetato de butila e xileno (xilol) e inclusão desse tecido em parafina, o que ocorre a uma temperatura de 60°C. Caso a fixação em formalina não seja eficiente, pode ocorrer a autólise do tecido. Todas estas etapas podem causar degradação do DNA dos tecidos parafinados que, em alguns casos, podem resultar em quantidades ínfimas de DNA.

Muitas das amostras analisadas no presente estudo vieram de outros Estados para o Laboratório Hermes Pardini. Por não haver uma padronização rigorosa para o envio de amostras histológicas e citológicas entre os laboratórios de análises clínicas, muitas são enviadas em fixadores não adequados ou até mesmo sem fixador, podendo acarretar autólise do tecido ou endurecimento do espécime, quando do uso de fixador não adequado ou

ausência de fixador, respectivamente. O tempo de fixação, quando superior a 24 horas, também compromete a extração de DNA destas amostras.

Estudo de Greer *et al.*, (1991) com tecidos humanos incluídos em parafina, usando PCR, revelou que após 24 horas de fixação em formalina 10% tamponada (fixador padrão), o mesmo usado nas amostras estudadas, a eficiência da amplificação do DNA diminui. Caso a fixação do material ocorra de oito até 30 dias a eficiência de amplificação pode cair de 1327 pb para 536 pb, respectivamente. Além disso, quanto maior o tempo de arquivamento dos blocos de parafina contendo tecido humano, menor é a probabilidade de se amplificar fragmentos superiores a 536 pb. As amostras do nosso estudo estavam, no mínimo, há três anos arquivadas, o que pode ser uma possível explicação para o baixo rendimento ou ausência de amplificação.

4.2- Características da biblioteca de clones do gene de rRNA 16S

Uma biblioteca de clones do gene de rRNA 16S de 01 dos 20 indivíduos estudados, foi construída para obter informação sobre a composição bacteriana da pele de indivíduos com Hanseníase. Esse paciente trata-se de um homem de aproximadamente 69 anos com lesões presentes no tórax e braços. Cinquenta e nove sequências de rDNA 16S foram obtidas após controle de qualidade e remoção das sequências quiméricas. Os clones que apresentaram a mesma sequência foram considerados como pertencentes a uma mesma OTU (Tabela 2). O fragmento do gene de rRNA 16S usado para

análise filogenética foi de aproximadamente 600 pb e cobria as regiões variáveis V2 a V5, do gene de rRNA 16S de *Escherichia coli* K12.

Tabela 2: Características da biblioteca do gene de rRNA 16S de lesão de pele de indivíduo com Hanseníase.

Parâmetros	
Nº de clones sequenciados	88
Nº de sequências quiméricas	29
Nº OTUs	27
Cobertura da biblioteca (%)	73
Índice Shannon	2,92
Índice de Simpson	0,068
ACE	70,14
Chao	45

A curva de rarefação da biblioteca (Figura 10) obtida, plotando o número de OTUs encontradas na biblioteca em relação ao número de clones sequenciados, não demonstrou tendência à estabilidade do número de OTUs detectadas, sugerindo que maior número de clones deve ser sequenciado, o que poderia revelar diversidade adicional. Este resultado foi suportado pela cobertura da biblioteca que foi de 73%.

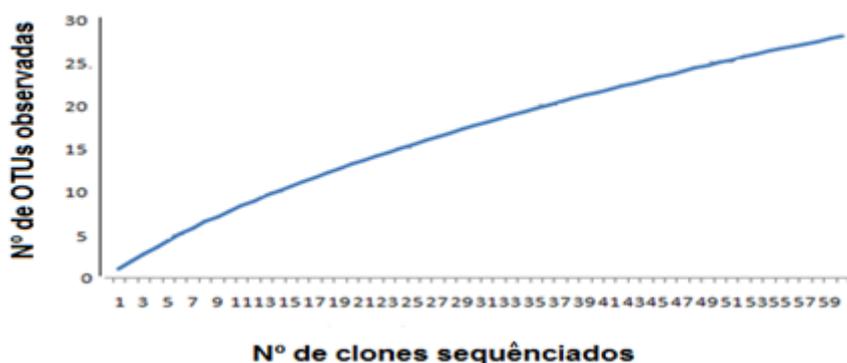


Figura 10: Curva de rarefação dos clones do gene de rRNA 16S bacteriano sequenciados e do número de OTUs da biblioteca.

A diversidade e a riqueza de espécies podem ser avaliadas por índices estatísticos paramétricos e não paramétricos, que levam em consideração informações taxonômicas. Alguns índices, como de Shannon (riqueza de espécies, número de diferentes espécies presentes em uma amostragem) e de Simpson (equitabilidade, proporção do número de indivíduos de cada espécie relativa ao total de indivíduos da comunidade), podem fornecer informações importantes do padrão de distribuição de espécies microbianas em um ecossistema (Magurran, 1988). A diversidade de clones da biblioteca do gene de rRNA 16S foi avaliada por meio dos índices de Shannon e Simpson (Tabela 2). Estes índices são frequentemente utilizados para análise da diversidade. O índice de diversidade de Shannon foi de 2,89, sugerindo diversidade moderada no nível de espécie ($\geq 97\%$ de corte nas OTUs). Este índice é o mais amplamente usado em ecologia, onde valores típicos caem entre 1,5 e 4, com os maiores valores significando maior diversidade (Solano et al., 2009). Considerando o índice de Simpson, a estimativa de diversidade no nível de espécie ($\geq 97\%$ de corte nas OTUs) foi de 0,068. Este valor representa a

probabilidade de 6,8% de duas OTUs tomadas ao acaso da biblioteca pertencerem à mesma espécie. Os índices ACE e de Chao1 foram 70,14 e 45, respectivamente (Tabela 2). Grice *et al.*, (2009) relataram valores do índice de Shannon do sítio manúbrio variando de 1,5 a 2,5.

4.3- Composição da comunidade bacteriana

Diversos métodos são utilizados para colheita de bactérias em espécimes de pele humana, como biópsia (*punch*), *swab* e raspagem (*scrape*). Grice e colaboradores (2009) compararam a diversidade da microbiota da pele de indivíduos saudáveis com estes métodos, mais ou menos invasivos, e detectaram populações bacterianas similares. Portanto, o método de amostragem por biópsia, usado no presente estudo, permite a comparação de nossos resultados com outros estudos, onde foram utilizados métodos de colheita diferentes.

Para determinar a diversidade bacteriana associada à pele lesionada de indivíduo com Hanseníase 27 OTUS foram submetidas à análise filogenética, revelando que a biblioteca de clones abrigou quatro filos: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria. A abundância dos filos e a árvore filogenética estão apresentadas nas Figuras 11 e 12, respectivamente. A maioria das sequências obtidas apresentou identidade com bactérias cultiváveis dos mais variados ambientes, como pele, solo, água e plantas, dentre outros (Tabela 3).

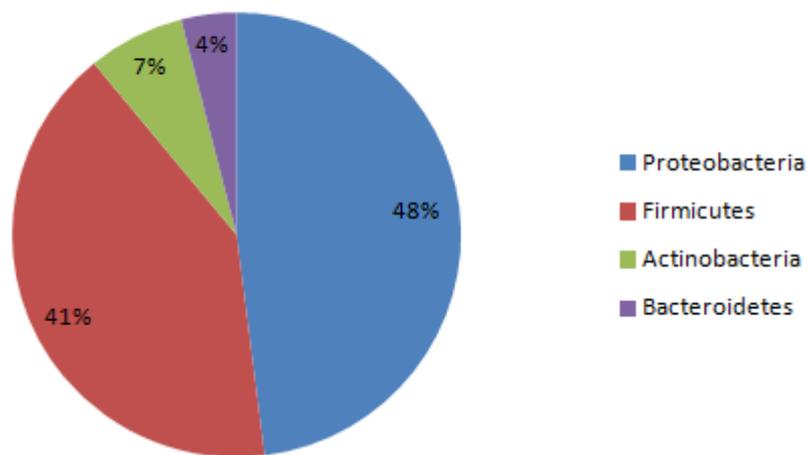


Figura 11: Distribuição dos filos encontrados na biblioteca do gene de rRNA 16S da pele lesionada do indivíduo com Hanseníase.

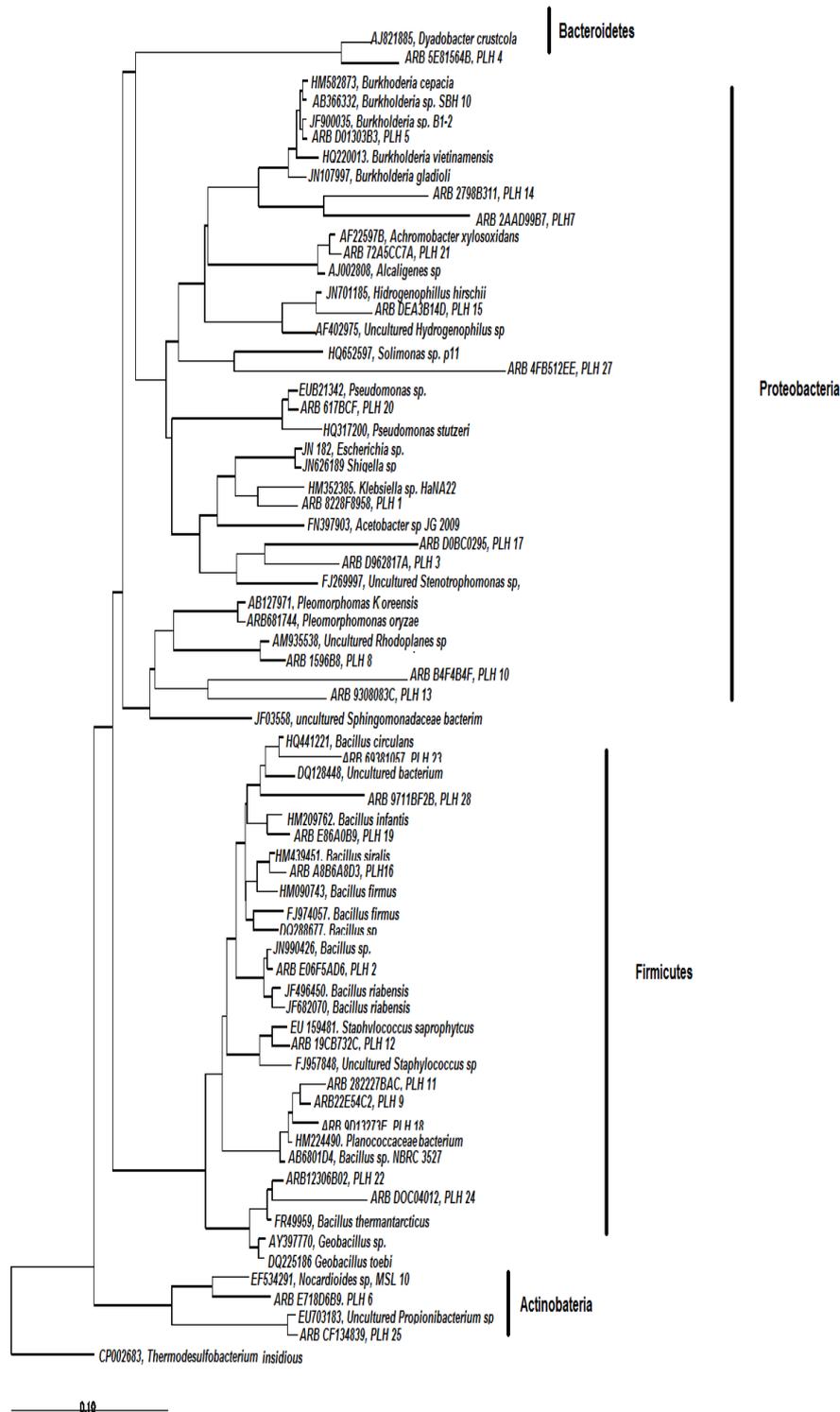


Figura 12: Árvore filogenética das OTUs bacterianas encontradas na pele lesionada de indivíduo com Hanseníase (PLH – Pele Lesionada Hanseníase)

Tabela 3: Filiação filogenética e distribuição dos clones bacterianos analisados da pele de indivíduos com Hanseníase

Filo	OTU	Nº de Clones	Sequência/ bactéria com maior identidade	Família/Ordem/Classe	Nº de acesso	Identidade	Fonte
Actinobateria	1	2	<i>Nocardioides sp</i>	Nocardioideaceae	AB167236.1	96%	Quimiostato (etanol)
	2	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Propionibacteriaceae	NR_074675.1	99%	Pele humana (strain KPA171202)
Bacteriodetes	3	4	<i>Dyadobacter fermentans</i>	Cytophagaceae	CP001619.1	97%	Milho (haste)
Firmicutes	4	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	KC213963.1	99%	Intestino de peixe (<i>Rutilus rutilus</i>)
	5	1	<i>Bacillus soralis</i>	Bacillaceae	HM439461.1	99%	Cebola Fermentada
	6	1	<i>Planococcaceae bacterium TPD42</i>	Planococcaceae	HM224490.1	98%	Água congelada de rio
	7	1	<i>Bacillus sp. CNJ905 PL04</i>	Bacillaceae	DQ448753.1	99%	Sedimento marinho
	8	12	<i>Lysinibacillus sp</i>	Bacillaceae	JX217747.1	99%	Soja fermentada
	9	1	<i>Geobacillus thermantarcticus</i>	Bacillaceae	FN428692.1	99%	Não descrito
	10	2	<i>Bacillus sp. M71_N104b</i>	Bacillaceae	FM992794.1	97%	Água especificar a água de onde?
	11	1	<i>Bacillus circulans</i>	Bacillales	FJ581445.1	91%	Lodo (estação poluída)
	12	1	<i>Geobacillus sp. BGSC 20A1</i>	Bacillaceae	AY608980.1	92%	Não descrito
	13	1	<i>Bacillus longiquaesitum</i>	Bacillaceae	AM747042.1	93%	Solo
	14	4	<i>Bacillus sp.</i>	Bacillaceae	DQ249996.1	96%	Rocha de caverna

Tabela 3- Continuação

Filo	OTU	Nº de Clones	Sequência/ bactéria com maior identidade	Família/Ordem/Classe	Nº de acesso	Identidade	Fonte
Proteobacteria	15	1	<i>Pleomorphomonas oryzae</i>	Methylocystaceae	AB681744.1	93%	Arroz
	16	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	JN897382.1	99%	Estação de tratamento de água (resíduos)
	17	2	<i>Pseudoxanthomonas yeongjuensis</i>	Xanthomonadaceae	NBRC 106397	92%	solo de um campo de ginseng coreano
	18	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Burkholderiaceae	HQ284839.1	99%	Folhas de planta
	19	1	<i>Hydrogenophilus hirschii</i>	Hydrogenophilaceae	FR749905.1	96%	Vulcão (Solfatara)
	20	1	<i>Stenotrophomonas sp. 2R13</i>	Gammaproteobacteria	EF178465.1	84%	Arroz
	21	2	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	Burkholderiaceae	JQ283970.1	99%	Solo (rizosfera) plantação de gengibre
	22	1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Pseudomonadaceae	KC244183.1	99%	Rejeitos de mina de cobre
	23	2	<i>Burkholderia cepacia</i>	Burkholderiaceae	AB695353.1	97%	Não descrito
	24	1	<i>Achromobacter sp</i>	Alcaligenaceae	JN836430.1	99%	Campo de Soja
	25	9	<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	Sphingomonadaceae	AB680768.1	99%	Swab vaginal
	26	1	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>	Gammaproteobacteria	EU640742.1	97%	Lago de Michigan
	27	2	<i>Uncultured Rhodoplanes sp.</i>	Hyphomicrobiaceae	AM935538.1	98%	Solo contaminado

Estudos sobre a diversidade da microbiota da pele de indivíduos saudáveis têm sido realizados (Gao *et al.*, 2008; Grice *et al.*, 2009; Costello *et al.*, 2009; Blaser *et al.*, 2013). Nestes estudos, a análise filogenética do gene de rRNA 16S da pele saudável de diversos sítios revelou 19 (Grice *et al.*, 2009), 20 (Blaser *et al.*, 2013), 22 (Costello *et al.*, 2009) e 25 (Gao *et al.*, 2008) filos, sendo Actinobacteria (52%, 27%, 45% e 48,0%) Proteobacteria (17%, 33%, 10,0% e 22,0%,) Firmicutes (24,4%, 29,0%, 38,0% e 24,4%) predominantes, respectivamente (Figura 13). Em nosso estudo houve predominância destes mesmos filos, embora com distribuição distinta (Figura 11)

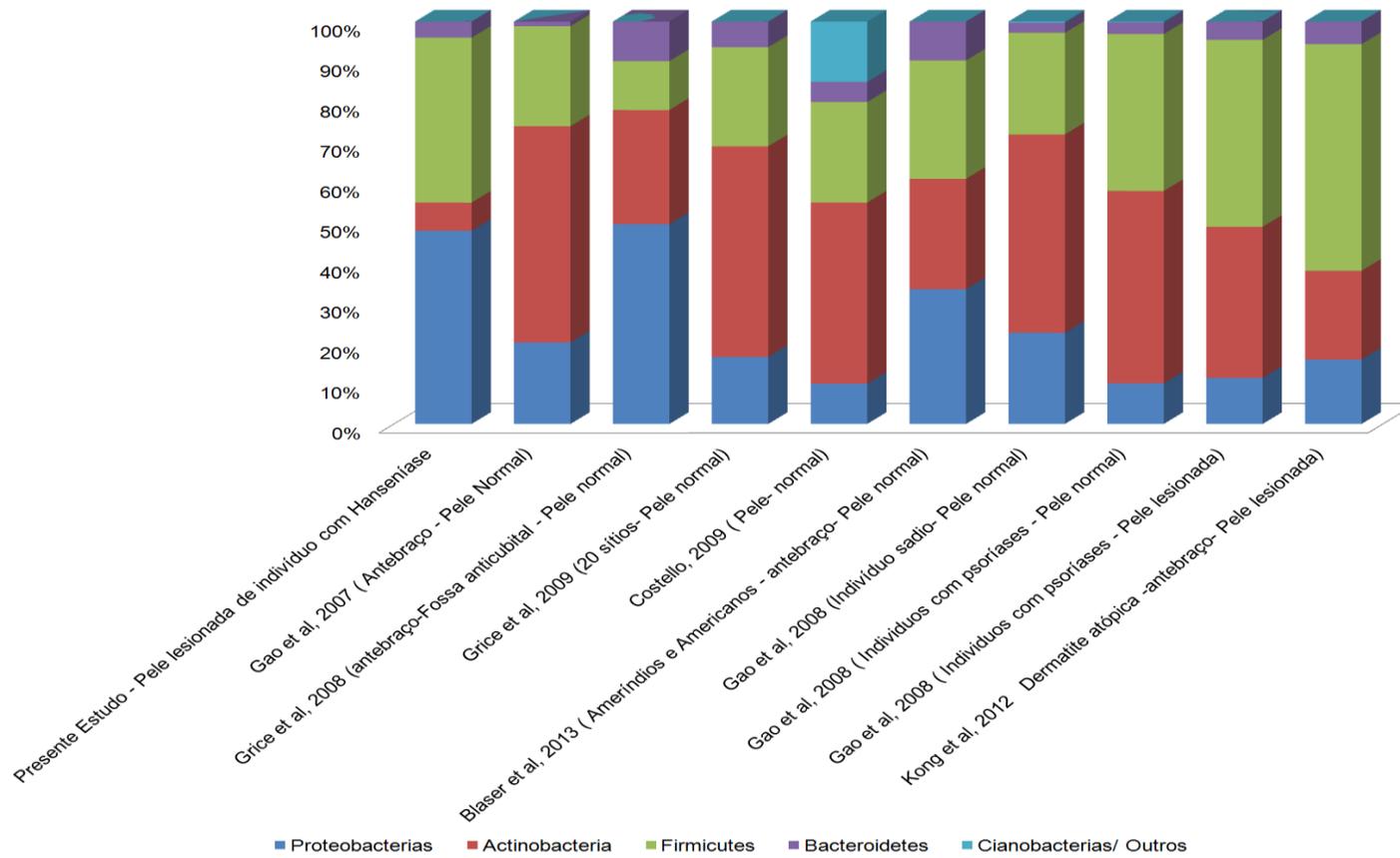


Figura 13: Distribuição dos filos encontrados no presente estudo comparados a outros dados descritos na literatura.

Actinobacteria, o filo mais predominante e diverso na pele normal de indivíduos saudáveis (Grice *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2007 e 2008), foi significativamente sub-representado na pele lesionada de indivíduo com Hanseníase (4%). O filo Actinobacteria abriga gêneros, como *Corynebacterium* e *Propionibacterium*, constituintes da microbiota indígena da pele normal, como mostrado em estudos dependentes (Dekio *et al.*, 2005) e independentes de cultivo (Gao *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2012). Entretanto, em nosso estudo foi encontrado apenas o gênero *Propionibacterium*, representado por apenas uma OTU. De acordo com Gao e colaboradores (2008), estudando pele lesionada por psoríase, este número reduzido pode ser consequência de alterações do nicho que passam a ser desfavoráveis a estas bactérias e que poderia estar relacionado com a patogenicidade ou como efeito do tratamento da psoríase. Além disso, a ordem Actinomycetales a qual abriga a espécie *Mycobacterium leprae* foi representada no nosso estudo pelo gênero *Nocardiodetes*.

Além disso, os filos Proteobacteria (48%) e Firmicutes (41%) foram os mais abundantes na pele lesionada de indivíduo com Hanseníase, enquanto em estudos da pele de indivíduos saudáveis (Grice *et al.*, 2009; Blaser *et al.*, 2013; Costello *et al.*, 2009 e Gao *et al.*, 2008) sua distribuição variou de 10 a 33% para Proteobacteria e de 24 a 38% para Firmicutes. Portanto, estes dados sugerem que a Hanseníase está associada com mudança significativa na composição e distribuição de bactérias da pele.

Deve-se destacar que ao contrário de outros estudos (Grice *et al.*, 2009; Costello *et al.*, 2009 e Gao *et al.*, 2008), Blaser e colaboradores (2013) encontraram maior abundância do filo Proteobacteria (33%), dentre os 25 filos obtidos, na pele de ameríndios da América do Sul, quando se comparou com o grupo de referência – indivíduos saudáveis de Nova York e Colorado (USA). Para explicar esta diferença estes pesquisadores sugeriram que a etnia, estilo de vida e/ou geografia estariam associadas com a estrutura de comunidade bacteriana da pele. O filo Bacteroidetes foi o que apresentou menor variação, quando comparado com os dados obtidos em todos os estudos mencionados anteriormente. Além disso, Gao e colaboradores (2008) revelaram que o filo Firmicutes foi o mais abundante (46,2%) na região da pele lesionada (psoríase), enquanto Actinobacteria predominou na pele normal de indivíduos com (47,8%) e sem psoríase (47,6%).

Dezenove OTUs foram afiliadas nos níveis dos seguintes gêneros (95%) ou espécies ($\geq 97\%$) (Tabela 2 e Figura 13): *Nocardioides*, *Propionibacterium*, *Dyadobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Klebsiella*, *Hydrogenophylus*, *Geobacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Sphingomonas*. Além disso, sete OTUs foram afiliadas à classe Gammaproteobacteria (1OTU), à ordem Bacillales (1 OTU) e as famílias Bacillaceae (3 OTUS), Methylocystaceae (1 OTU) e Xanthomonadaceae (1 OTU), podendo representar novos táxons.

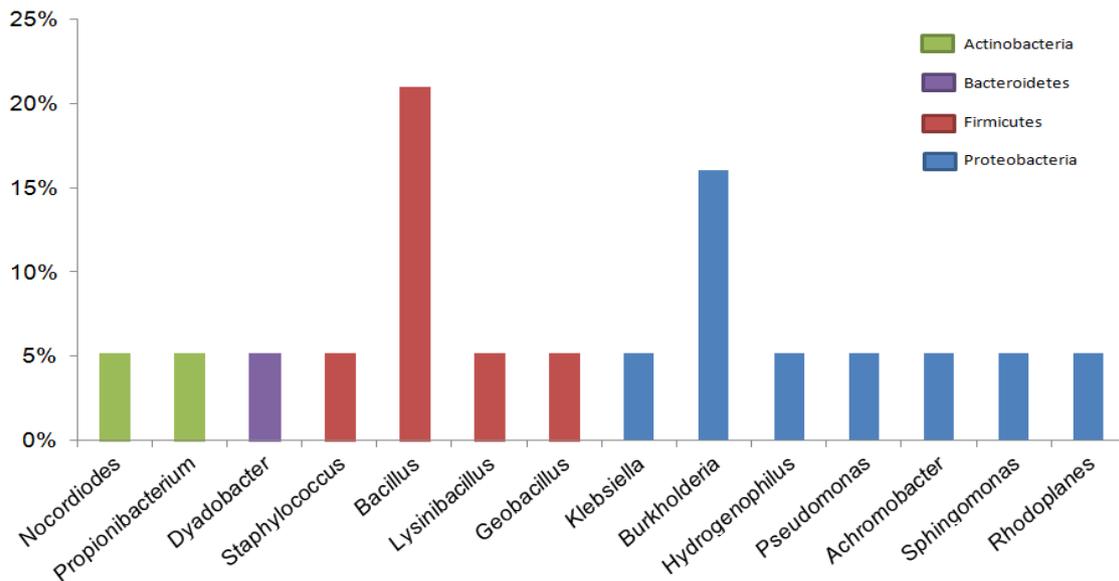


Figura 14: Distribuição dos gêneros encontrados na biblioteca do gene 16S de rRNA de pele lesionada de indivíduo com Hanseníase.

Dentre estes gêneros *Staphylococcus* e *Propionibacterium* têm sido descritos como os mais abundantes da pele sadia (Grice *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2008; Blaser *et al.*, 2013), bem como *Corynebacterium*, o qual não foi detectado na nossa biblioteca de clones do gene de rRNA 16S do indivíduo com Hanseníase. Em contraste, os gêneros *Bacillus* (21%) e *Burkholderia* (16%) foram os mais abundantes. Destaca-se que estes gêneros não têm sido identificados, por outros autores, na pele de indivíduos sadios e com doença dermatológica. *Pseudomonas* tem sido identificada em estudos com pele sadia (Gao *et al.*, 2007; Blaser *et al.*, 2013) e lesionada de indivíduos com psoríase (Gao *et al.*, 2008). Deve-se ainda ressaltar que a maioria dos gêneros encontrados é normalmente isolada de ambientes naturais, como solo, vulcão e plantas (Tabela 2). Portanto, a presença destes gêneros sugere que na pele lesionada de indivíduo com Hanseníase o comprometimento da barreira cutânea poderia ter facilitado o acesso dessas bactérias normalmente ausentes da pele de indivíduos sadios.

5 - Conclusão

Diversos estudos moleculares da diversidade da microbiota bacteriana da pele de indivíduos saudáveis de diferentes etnias e regiões geográficas indicam uma microbiota personalizada, com mudanças nas escalas espacial (topográfica) e temporal. Entretanto, os filos Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes são sempre predominantes. Assim, apesar de diferenças na metodologia entre este estudo e de outros pesquisadores nossos dados são concordantes no nível de filo, mas apontam mudança significativa na abundância destes táxons, bem como na composição de gêneros. Este é o primeiro estudo da diversidade da microbiota bacteriana da pele lesionada de indivíduo com Hanseníase, fornecendo dados essenciais para detectar diferenças da microbiota bacteriana associada a esta doença.

6- Referências Bibliográficas

ABRALAPAC (Associação Brasileira de Laboratórios de Anatomia Patológica e Citopatologia) Disponível em: <http://www.abralapac.org.br/v3/index.php> acessado em 13 de março de 2013.

Andrade P. Vitor., Werneck C. Isabela., Silva M. Edaise., Ayala.Fernanda., Sato. Yukie., Ferreira S. Severino., Nascimento F. Carlos & Soares A. Fernando.(2007) O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. J.Bras.Patol.Med 43 (1):

Blaser J. Martin., Dominguez-Bello G. Maria., Contreras. Monica., Magris. Magda., Hidalgo. Glida., Estrada. Isidoro., Gao. Zhan., Clemente C. Jose., Costello K. Elizabeth & Knight. Rob. (2013). Distinct cutaneous bacterial assemblages in a sampling of South American Amerindians and US residents.The ISME Journal 7: 85–95

Borea A. Jaqueline., Pardini.M.C.I. Maria & Gushiken. Tsieko. (2004) Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). Revista Brasileira de Hemoterapia: 274-281

Britton J. Warwick (2004) Leprosy. The lancet 363: 1209-1219.

Cole S.T., Eiglmeier.K., Parkhill J., James D.K., Thomson N. R. (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature (09): 1007-1011

Costello K. Elizabeth., Lauber L. Christian., Hamady. Micah., Fierer. Noah & Gordon I. Jeffrey., Knight. Rob (2009) Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. Science 326: 1694-1697.

Dekio. Itaru., Sakamoto M., Hayashi H ., Kitahara M. Amagai., Masayuki., Suematsu. Makoto & Benno. Yoshimi. (2005) Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. *J.Med.Microbiol.* 54: 1231-1238

Dekio. Itaru., Sakamoto. Mitsuo., Hayashi. Hidenori., Amagai. Masayuki., Suematsu & Makoto Benno Yoshimi. (2007) Characterization of skin microbiota in patients with atopic dermatitis and in normal subjects using 16S rRNA gene-based comprehensive analysis. *Journal of Medical Microbiology,* 56, 1675-1683

Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.-P. & Raoult D. (2000) 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of clinical Microbiology,* 34: 3623- 3630.

Erwing B, Green P. (1998) Base- calling of automated sequencer traces using Phred II, error probabilities. *Genome Research.* 8: 186-194.

Firooz. Alireza., Sadr. Bardia., Babakoochi. Shahab., Sarraf-Yazdy. Maryam., Fanian. Ferial., Kazerouni-Timsar. Ali., Nassiri-Kashani. Mansour., Naghizadeh. MohammadMehdi., & Dowlati. Yahya. (2011) Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender, and Body Region. *The Scientific World Journal* 2012: 1a 5

Gao. Zhan., Tseng. Chi-hong., Pei. Zhiheng & Blaser J. Martin. (2007) Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *The National Academy of Sciences of the USA (PNAS)* 104 (8), 2927-2932

Gao. Zhan., Tseng. Chi-hong., Strober E. Bruce., Pei. Zhiheng & Blaser J. Martin. (2008) Substantial Alterations of the Cutaneous Bacterial Biota in Psoriatic Lesions. PLoS ONE 3(7): 1-9.

Good, I.J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biometrika 40: 237–262.

Gordon D, Abajian C, Green P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Research. 8: 195–202.

Green P. (1994). PHRAP documentation. <http://www.phrap.org>.

Greer E. Catherine., Lund K. Judi & Manos. Michele.(1991) PCR amplification from paraffin for long- term storage and prospective studies Genome Research 1: 46-55.

Grice A. Elizabeth., Kong H. Heidi., Renaud. Gabriel., Young C. Alice., Bouffard G. Gerard., Blakesley W. Robert., Wolfsberg G. Tyra., Turner L. Maria & Segre A .Julia. (2008) A diversity profile of the human skin microbiota. Genome Research 18: 1043 a 1050

Grice A. Elizabeth., Kong H. Heidi., Conlan. Sean., Deming. Clayton B., Davis. Joie., Young. Alice C., Bouffard G. Gerard., Blakesley W. Robert., Murray R. Patrick., Green D. Eric., Turner L. Maria & Segre A. Julia. (2009) Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. Science 324: 1190-1191

Grice A. Elizabeth & Segre A. Julia. (2011) The skin microbiome *Nat Rev Microbiol* 9(4): 244–253

Grossi. Marcelo A. (2003) Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36 (3): 373-382

Gürtler V. & nV.A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 142:3–16.

Handelsman J. (2004) Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:669–685.

Hasen. Disponível em:

http://hansen.bvs.ilsi.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoos/PDF/aspecto_leprae.pdf acessado em: 13 de março de 2013

Hill T.C.J., Walsh K.A., Harris J.A. & Moffett B.F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 1-11.

Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. (2004) Bellerophon: A program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinforma* 20:2317-2319

Hugenholtz P., Goebel B.M. & Pace N.R. (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J Bacteriol.* 180: 4765–4774.

Hughes J.B., Hellmann J.J. & Ricketts T.H. (2001) Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4399–4406.

“Human Microbiome Project (HMP)”

Disponível em: <http://commonfund.nih.gov/hmp/> Acessado em: 12 de março de 2013

Joyce M. Patricia. (2012) Historic aspects of human susceptibility to leprosy and the risk of conjugal transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107 (Supl. I): 17-21

Kong H, Heidi., Oh. Julia., Deming. Clay., Conlan. Sean., Grice A. Elizabeth., Beatson A. Melony., Nomicos. Effie., Polley. Eric., Komarow D. Hirsh., Murray R. Patrick., Turner L. Maria & Segre A Julia. (2012) Temporal shifts in the skin microbiome associated with atopic dermatitis disease flares and treatment. *Genome Research*: 1-36.

Magurran E. Anne. (1988) *Ecological Diversity and Its Measurement*. Princeton University Press. New Jersey.

Martins. Mariane A.S. (2008) Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(suplemento II): 89-94

Ministério da Saúde. (1960) *Manual de leprologia*. Departamento nacional de saúde. Serviço nacional de lepra. Serviço nacional da letra. Rio de Janeiro – Brasil.

Nascimento A.M.A. (2011) Use of the rRNA operon and genomic repetitive sequences for the identification of bacteria. *In* de Bruijn F.J. (ed.), Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches. John Wiley & Sons, Inc.

Pei Y. Anna., Oberdorf E. William., Nossa W. Carlos., Agarwal. Ankush & Chokshi. Rooja. (2010) A Diversity of 16S rRNA genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (12): 3886-3897

Pena. Maria L. Fernandes .(2012) Leprosy frequency in the world,199-2010. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Suppl. I)*: 3-12

Portal da Saúde. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_hanseniose.pdf Acessado em:12 de março de 2013

Pruesse EC., Quast K., Knittel B., Fuchs W., Ludwig J., Glöckner P., Glöckner FO. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35:7188-7196

Rappé M.S. & Giovannoni S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* 57:369-394.

Rosselló-Mora R. & Amann R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25:39–67.

Roth R. Rudolf & James D. William. (1988) Microbial ecology of the skin. Ann. Rev. Microbiol. 1988. 42:441-64

Saitou N & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4: 406-425.

SAVK. Disponível em: http://www.savk.org.br/fique_hanseniose.htm

Acessado em: 12 de março de 2013.

Schloss PD, Handelsman J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Appl Environ Microbiol 71:1501–1506

Simonato L. Estevam., Gracia F. José., Nunes M. Cárís & Miyahara I. Glauco. (2007) Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial. 3 (2): 121-127.

Solano. Godofredo., Jiménez. Rojas. Keilor., Jaspars. Marcel & Tamayo C. Giselle (2009) Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. Antonie van Leeuwenhoek 96:71-78.

Staley J. T & Konopka. A (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and temporal habitats. *Annu. Rev. Microbiol* 39: 321-346

Woese C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221–27

7 - Anexos

Anexo I

Parecer 231 da Sociedade Brasileira de Patologia

III - DECRETO nº 12.479, de 18 de outubro de 1978, da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, que aprova norma técnica especial relativa às condições de funcionamento dos estabelecimentos sob responsabilidade de médicos, dentistas, farmacêuticos, químicos e outros titulares de profissões afins.

Artigo 45, Inciso II - Laboratórios de Anatomia Patológica.

1. Arquivo de resultados técnicos mantidos, pelo menos durante 5 anos, em ordem cronológica.

2.

3.

4. Arquivo de lâminas, e blocos, com finalidade de documentação e ensino, mantidos pelo menos, durante 5 (cinco) anos

A legislação vigente sobre o assunto dispõe:

1. As peças anatômicas fixadas devem ser mantidas, no mínimo, durante 03 meses.

2. As lâminas para estudos citológicos e histopatológico devem ser mantidas, no mínimo durante cinco (05) anos;

3. Os blocos de parafinas devem ser mantidos, no mínimo durante 05 (cinco) anos.

Finalmente, findo os prazos mínimos acima fixados, para cada situação, tanto as peças anatômicas fixadas como as lâminas de citologia, histopatologia e os blocos de parafina podem ser destruídos.

Considerando os dispositivos legais vigentes, a Sociedade Brasileira de Patologia recomenda que:

1. No prazo legalmente estabelecido para a guarda de blocos e lâminas histológicas, estes só poderão ser retirados do Laboratório de Patologia com a autorização expressa e devidamente protocolada do paciente ou de seu representante legal, obrigando-se o uso de Termo de Consentimento Informado, para esclarecimento do objetivo da cessão do material.

2. Findo o prazo de cinco anos, estabelecido para a guarda de blocos histológicos, não é recomendável proceder à destruição imediata dos mesmos.

3. Os blocos histológicos ou laminas que seriam descartados após o prazo legal de guarda (material biológico estocado) poderão ser utilizados em pesquisa médica, desde que:

- A pesquisa seja aprovada pela Comissão de Ética do estabelecimento onde é realizada.
- Não se permita acesso aos dados de identidade do paciente que forneceu o material ou outras informações que possam vir a identificá-lo.
- O resultado desta pesquisa não gere informações que possam resultar em benefícios ou riscos para o paciente ou seus familiares.

4. Como a cessão de material especializado é prova do peso dos dados histopatológicos, citopatológicos ou imunoistoquímicos, no trabalho científico ou pesquisa médica propostos, torna-se imprescindível que tal compartilhamento represente vínculo de autoria ou co-autoria. Tal reconhecimento deve ser expresso pelo autor do projeto, em documento protocolado na entrega dos blocos, lâminas, fotos, laudos ou relatórios solicitados, em harmonia com o que dispõe o Código de Ética Médica, nos artigos 137º, 138º e 139º

MANIFESTAÇÃO DA ASSESSORIA JURÍDICA:

“Sobre a guarda dos blocos de parafina e lâminas entendo que, face às mudanças do Novo Código Civil sobre a prescrição e havendo a possibilidade de pedido de ação de reparação civil com prazo de prescrição vintenária, entendo que os blocos e as laminas devam permanecer guardados por 20 anos.

Em relação à cessão de material biológico para pesquisa científica a Resolução 196/96 que regulamente as pesquisas envolvendo seres humanos, no item IV. 2 letra c determina que: **“nos casos em que seja impossível registrar o consentimento livre e esclarecido, tal fato deve ser devidamente documentado com explicação das causas da impossibilidade e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa”**.

Desta forma a utilização de qualquer material biológico identificado necessita de termo de consentimento informado, porém quando o banco de dados trata-se de material biológico estocado (bloco de parafinas, laminas) ou materiais biológicos que seriam descartados após terem sido utilizados para fins de diagnósticos, estes poderão ser utilizados, desde que:

- Que não tenha acesso aos dados de identidade do paciente que forneceu o material ou outras informações que possam vir a identificá-lo.
- Que o resultado desta pesquisa não gere informações que possam resultar em benefícios ou riscos para o paciente ou seus familiares.

Cabe salientar: para que a utilização seja realmente de material não identificável o paciente deve ser anônimo e a pesquisa isenta de conseqüências.

Esta situação deve ser documentada exigindo-se dos pesquisadores documentos onde as condições de resguardo da privacidade das pessoas que tiveram seus materiais biológicos foi plenamente preservada.

Quando o material de biópsia for pequeno (agulha) sabendo-se que é provável que o material se perca em recortes sucessivos, o patologista só deve fornecer lâmina com mais de vinte anos.