

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear da Agricultura**

**Análise comparativa do microbioma intestinal de quatis (*Nasua nasua*) que vivem em
ambientes naturais e antropizados**

Teresa Maria Lorizolla Mafra
Número USP: 12717680
Orientador: Lucas Willian Mendes
Coorientador: Kátia Ferraz

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
em Ciências Biológicas

Piracicaba
Outubro, 2024

RESUMO

Este projeto de pesquisa visa realizar uma análise comparativa do microbioma intestinal de quatis (*Nasua nasua*) que habitam ambientes naturais e antropizados. O microbioma intestinal, uma comunidade complexa de microrganismos que inclui bactérias, arqueas, fungos e vírus, desempenha funções cruciais na digestão, produção de nutrientes e na resistência contra patógenos. A adaptação desse microbioma às condições ambientais é fundamental, uma vez que alterações no habitat podem modificar sua composição. Os quatis, mamíferos onívoros da família Procyonidae, são altamente adaptáveis e ocupam diversos habitats, desde florestas tropicais até áreas urbanizadas. Essa capacidade de adaptação torna-os um modelo ideal para investigar como o microbioma intestinal é influenciado por ambientes alterados pela ação humana. A coleta de amostras fecais, um método não invasivo, possibilita a análise do microbioma sem comprometer o bem-estar dos animais. Pesquisas anteriores demonstraram que ambientes antropizados podem levar à redução da diversidade microbiana intestinal, afetando a saúde digestiva e imunológica dos quatis. Assim, este estudo busca explorar como as diferenças na composição do microbioma intestinal entre quatis em ambientes naturais e antropizados podem impactar suas funções biológicas e sua capacidade de adaptação. Os resultados esperados contribuirão para a compreensão dos efeitos das atividades humanas na saúde da fauna silvestre, promovendo estratégias de conservação e manejo sustentável.

Palavras-chave: quatis; microbioma intestinal; ambiente antropizado.

1. INTRODUÇÃO

O microbioma intestinal corresponde à comunidade de microrganismos presente no sistema digestivo dos animais, exercendo funções cruciais como auxiliar na digestão, produzir nutrientes, combater patógenos e fortalecer a resistência contra eles (LAFFERTY, *et al.*, 2022; ZHENG *et al.*, 2024; AWOSILE, *et al.*, 2023). Esse campo de estudo tem sido cada vez mais explorado em pesquisas voltadas para conservação ambiental e avaliação dos impactos das atividades humanas na saúde e bem-estar animal. A importância desse microbioma reside em sua capacidade de adaptação ao ambiente do indivíduo, o que significa que alterações nas condições ambientais podem modificar sua composição. Esse conjunto microbiano inclui diversos organismos como bactérias, arqueas, fungos e vírus, que habitam principalmente o trato gastrointestinal (GANI, *et al.*, 2024; CAO, *et al.*, 2022).

A coleta do microbioma intestinal é feita através das fezes dos animais, um método que não interfere diretamente no bem-estar deles. Isso facilita a obtenção de informações importantes de forma segura. Métodos de sequenciamento modernos, como o sequenciamento metagenômico shotgun e o 16S rRNA, são amplamente utilizados na pesquisa microbiológica para analisar a composição microbiana e entender como ela se adapta a diferentes dietas e habitats (GANI, *et al.*, 2024; CAO, *et al.*, 2022).

Os quatis, também chamados de coatis, pertencem ao gênero *Nasua* e à família *Procyonidae*, onde se incluem os guaxinins. Esses animais são diurnos e onívoros, com uma dieta variada que vai de frutas e insetos a pequenos vertebrados (BEISIEGEL, 2001). Eles são altamente adaptáveis e se encontram tanto em florestas tropicais quanto em áreas urbanizadas, onde frequentemente buscam alimento em zonas habitadas por humanos. Em termos sociais, os quatis vivem em grupos chamados bandos, compostos em sua maioria por fêmeas e filhotes, enquanto os machos adultos costumam ser mais solitários. Além disso, exercem uma função ecológica importante ao dispersar sementes, ajudando na regeneração das florestas.

Como o microbioma intestinal dos animais está fortemente relacionado ao ambiente onde o indivíduo vive, locais alterados pela ação humana (ambientes antropizados) podem trazer efeitos negativos para a saúde dos animais silvestres. Por exemplo, em estudos com macacos, verificou-se uma redução na diversidade microbiana intestinal em ambientes impactados, o que mostra a vulnerabilidade do microbioma nessas condições. Pesquisas recentes sugerem que as diferenças na microbiota intestinal entre mamíferos em habitats naturais e antropizados afetam substancialmente a saúde dos hospedeiros, especialmente nas funções digestivas e imunológicas (ZHANG, *et al.*, 2023; NGUYEN, *et al.*, 2024). Além disso, a estabilidade e a diversidade microbiana no intestino estão diretamente associadas à capacidade do hospedeiro de resistir a parasitas e de se adaptar a mudanças ambientais.

As mudanças ambientais promovidas por atividades humanas não apenas impactam diretamente o microbioma dos animais, mas também podem influenciar a ecologia e a evolução de toda a vida selvagem (DILLARD, *et al.*, 2022). Estudos recentes sobre microbiomas em mamíferos forneceram novas perspectivas que podem ajudar a conservação de várias espécies, ao revelarem como essas comunidades microbianas se ajustam a novos ambientes e dietas, sendo particularmente úteis para monitorar a saúde de carnívoros e outras espécies em risco.

2. JUSTIFICATIVA

O estudo do microbioma intestinal tem ganhado relevância nas pesquisas de conservação e manejo sustentável da fauna silvestre, especialmente por meio da análise de fezes, que são amostras não invasivas. Embora o microbioma intestinal dos quatis (*Nasua nasua*) tenha sido investigado em certa medida, a maior parte das pesquisas se concentra em seu papel como potenciais fontes de infecções para humanos (LALLO, *et al*, 2022), resultando em uma oferta limitada de estudos que analisem de forma abrangente esse microbioma.

A escolha dos quatis para este estudo se justifica pela sua tendência a andar em bandos, o que facilita a coleta de amostras fecais de maneira segura e eficiente. Além disso, os quatis demonstram uma notável capacidade de adaptação a diversos ambientes, incluindo áreas antropizadas. Isso torna interessante investigar como o microbioma intestinal desses animais é moldado pelo ambiente em que vivem, especialmente na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), onde eles são frequentemente avistados em busca de alimentos em pontos de ração para gatos e em lixeiras.

O presente estudo visa avaliar os impactos da urbanização na saúde e bem-estar dos quatis que habitam Piracicaba, contribuindo para a compreensão dos desafios que esses animais enfrentam em um ambiente em constante transformação.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar e comparar a composição do microbioma intestinal de *Nasua nasua* (quati) que vive em ambientes naturais e em ambientes antropizados, visando identificar possíveis variações associadas aos diferentes tipos de habitat.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar e comparar as diferenças na composição e diversidade do microbioma intestinal de indivíduos de *Nasua nasua* tanto em ambientes naturais quanto em ambientes antropizados, identificando os principais grupos bacterianos presentes.

Investigar possíveis fatores ambientais que podem estar influenciando as diferenças no microbioma intestinal.

Avaliar as implicações das diferenças no microbioma intestinal para a saúde e o bem-estar dos indivíduos em ambos os ambientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Áreas de estudo

A Estação Experimental de Tupi, situada em Piracicaba, São Paulo, é uma importante área florestal dedicada à pesquisa, conservação e educação ambiental (SÃO PAULO, 2013;). Com uma extensão de aproximadamente 198 hectares, a estação abriga remanescentes da Mata Atlântica e áreas de reflorestamento, sendo administrada pelo Instituto Florestal de São Paulo. Ela desempenha um papel fundamental na conservação ambiental e no avanço da pesquisa ecológica, preservando um ecossistema diversificado que abriga espécies nativas, incluindo os quatis, e ameaçadas, além de promover a regeneração de habitats naturais.. Através de práticas de manejo sustentável, ela colabora com instituições acadêmicas e ambientais, incluindo a ESALQ, desenvolvendo técnicas que equilibram a preservação ambiental com o uso consciente de recursos naturais, beneficiando tanto a biodiversidade quanto os serviços ecossistêmicos, como o clima e a água.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), localizada em Piracicaba, São Paulo, abrange um extenso campus de 914,5 hectares metros quadrados, marcado por sua infraestrutura impressionante e diversificada (SÃO PAULO, 2017). Este ambiente é rico em áreas verdes, incluindo bosques, jardins e espaços dedicados a atividades ao ar livre, que promovem um contato estreito com a natureza. A fauna local é igualmente variada, refletindo a riqueza dos habitats presentes no campus, onde é comum observar aves, pequenos mamíferos, incluindo quatis, répteis e insetos. Esses animais desempenham um papel crucial no equilíbrio ecológico da região. A combinação de áreas cultivadas e preservadas torna a ESALQ um laboratório natural, ideal para a observação e estudo da fauna, servindo como um recurso valioso para alunos e pesquisadores interessados na ecologia e na biodiversidade.

Neste estudo, serão coletadas cinco amostras de fezes de quatis (*Nasua nasua*) de indivíduos distintos em cada ambiente selecionado. A coleta das amostras será realizada em intervalos regulares de espaço, garantindo a representatividade das fezes coletadas. A coleta será feita por tubo tipo falcon 50 ml para análises laboratoriais.

4.2 Práticas laboratoriais

4.2.1 Extração de DNA

Os seres microbianos das comunidades microbianas do intestino serão avaliadas por meio de técnicas de biologia molecular. Para tanto, amostras do aparelho intestinal de todos os tratamentos serão utilizadas nas extrações de DNA, utilizando o QIAGEN QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit, seguindo as instruções de acordo com o fabricante. A qualidade e quantidade do DNA extraído serão analisados em gel de agarose 1% (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989) e em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). A comunidade bacteriana será acessada por meio do sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA.

4.2.2 Quantificação da comunidade procariótica

Para amplificar os genes presentes de seres bacterianos na região do intestino, será utilizado a técnica de PCR convencional quanto a de PCR em tempo real (qPCR) com o

SYBR Green PCR Kit (500), do QIAGEN, seguindo as instruções de acordo com o fabricante. A PCR convencional será empregada para amplificar regiões específicas do DNA (16S Bacteria) encontrados no intestino, com o objetivo de usá-los como referência na construção da curva padrão. A qPCR, por sua vez, será usada para quantificar a presença de micro-organismos no trato gastrointestinal, a partir do DNA extraído.

4.3 Análise de dados

4.3.1. Verificação da qualidade da amostra

Após a conclusão de todas as metodologias, a comunidade bacteriana será examinada a partir do gene marcador 16S. Para isso, será conduzido uma análise de controle de qualidade das sequências do 16S amplicon utilizando o programa FastQC. Se houver situações onde a qualidade das sequências forem baixas (inferior a Q = 20), será utilizada a ferramenta Trimmomatic para realizar o corte de regiões de baixa qualidade. Após isso, será realizado o pareamento das sequências R1 e R2 (forward e reverse, respectivamente) de cada amostra. Seguindo a análise da comunidade bacteriana, será procedido à classificação taxonômica dessa comunidade utilizando o programa QIIME 2 com o banco de dados Silva 138. Finalmente, serão realizadas análises estatísticas e de composição com o Software R e o pacote microeco, para interpretar a composição da comunidade, a diversidade, a distribuição, e a estrutura da mesma.

4.3.2. Gráficos de Diversidade

Gráficos de barras e boxplots serão gerados para comparar a diversidade alfa (riqueza e equidade de espécies) entre os grupos. Os boxplots serão utilizados para mostrar distribuições de dados, medianas e possíveis outliers. Curvas de raridade serão elaboradas para avaliar se a amostragem representou adequadamente a diversidade presente ou se há necessidade de novas coletas. Para análise da variação na composição do microbioma, gráficos de dispersão baseados em Análise de Componentes Principais (PCA) ou Análises de Coordenadas Principais (PCoA) serão usados, permitindo a visualização de padrões de agrupamento e diferenças entre as comunidades microbianas dos dois ambientes.

4.3.3. Análises de Beta Diversidade

Mapas de calor (heatmaps) serão gerados para identificar diferenças nas abundâncias relativas de táxons bacterianos entre as amostras. Diagramas de Venn serão utilizados para ilustrar os táxons compartilhados e exclusivos entre os grupos naturais e antropizados, destacando espécies presentes apenas em um dos ambientes.

4.3.4. Estatísticas e Testes

Para verificar diferenças estatisticamente significativas na diversidade microbiana entre os grupos, serão aplicados testes de Análise de Variância (ANOVA/MANOVA). Adicionalmente, testes de significância não paramétricos, como Kruskal-Wallis e PERMANOVA, serão empregados para comparar grupos, considerando distribuições que não seguem uma curva normal.

4.3.5. Redes de Co-ocorrência

Análises de redes serão realizadas para identificar e visualizar interações entre diferentes grupos de microrganismos. As redes de co-ocorrência permitirão a observação de relações simbióticas, competições ou padrões de co-existência que diferem entre ambientes naturais e antropizados.

5. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que caracterizar a diversidade bacteriana presente no trato gastrointestinal e esclareça sua influência na saúde e ecologia do hospedeiro; forneça insights sobre processos adaptativos e evolutivos, com aplicações diretas na conservação e manejo sustentável das espécies, preservando sua saúde e bem-estar; que amplie o conhecimento acerca da ecologia bacteriana presente no trato gastrointestinal de quatis, tanto indivíduos que vivem em ambientes naturais quanto indivíduos que vivem em ambientes antropizados (como a ESALQ), e contribua de modo significativo para a compreensão das suas características ambientais e funcionais ao longo do tempo, de modo a apoiar estudos futuros similares.

6. CRONOGRAMA

Tabela 1. Cronograma

Atividades	Meses					
	1	2	3	4	5	6
Coleta da amostra de fezes	X					
Extração de DNA		X				
qPCR de 16S		X				
Sequenciamento		X	X			
Análise de dados			X	X		
Escrita do TCC				X	X	
Apresentação e entrega do TCC						X

7. REFERÊNCIAS

NGUYEN, H. K. D., *et al.* **Wildlife microbiomes and the city: a systematic review of urban impacts on wildlife bacterial communities.** *Microbiota and Host*, v. 2, ed. 1, 2024. DOI: 10.1530/MAH-24-0003

DILLARD, B. A., *et al.* **Humanization of wildlife gut microbiota in urban environments.** *eLife*, 2022. DOI: 10.7554/eLife.76381

GANI, M., *et al.* **Habitat shapes the gut microbiome diversity of Malayan tigers (*Panthera tigris jacksoni*) as revealed through metabarcoding 16S rRNA profiling.** *World J Microbiol Biotechnol* vol. 40, n. art. 111, 2024. DOI: 10.1007/s11274-023-03868-x

CAO, H., *et al.* **Gut microbiota reveals the environmental adaption in gastrointestinal tract of wild boar in karst region of Southwest China.** *Annals Microbiol* vol. 72, n. art. 9, 2022. DOI: 10.1186/s13213-022-01669-5

LAFFERTY, D. J. R., *et al.* **The gut microbiome of wild American marten in the Upper Peninsula of Michigan.** *PLoS ONE*, v. 17, ed. 11, 2022. DOI:10.1371/journal.pone.0275850

ZHENG, P., *et al.* **High-Energy Supplemental Feeding Shifts Gut Microbiota Composition and Function in Red Deer (*Cervus elaphus*).** *MDPI*, v. 14, ed. 1428, 2024. DOI:10.3390/ani14101428

AWOSILE, B., *et al.* **Fecal Microbial Diversity of Coyotes and Wild Hogs in Texas Panhandle, USA.** *MDPI*, v. 11, ed. 5, 2023. DOI:10.3390/microorganisms11051137

LALLO, M. A., *et al.* **Identification of *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) Spores in Stool and Urine Samples Obtained from Free-Living South American Coatis (*Nasua nasua*).** *ASM Journals.*, v. 78, n. 12, 2012. DOI: 10.1128/AEM.07708-11

BEISIEGEL, B. M. **Notes on the coati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an Atlantic forest area.** *Scielo*, 2001. DOI: 10.1590/S1519-69842001000400020

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente. **Material educativo para monitores ambientais.** Instituto Florestal, 2013.

SÃO PAULO (Estado). Universidade de São Paulo. **USP em Piracicaba: o campus que também é parque.** *Jornal da USP*, 2017.

Handwritten signature of Teresa Mafra in black ink on a light blue rectangular background.

Teresa Maria Lorizolla Mafra

Handwritten signature of Prof. Dr. Lucas Willian Mendes in blue ink.

Prof. Dr. Lucas Willian Mendes

**TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL E DEMAIS
PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO DE PESQUISA**

À Comissão de Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Coc CB
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP

Com relação ao projeto de título Análise comparativa da microbiota intestinal de quatis (Nasua nasua) que vivem em ambientes naturais e antropizados, desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de Lucas William Mendes e com execução parcial ou total sob responsabilidade de Teresa Maria Lorizolla Mafra, declaramos que:

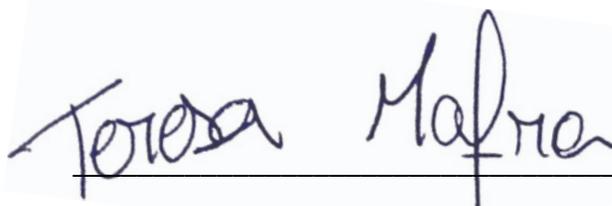
1. Estamos cientes do conteúdo e assumimos o compromisso de cumprir os termos das Leis e Decretos complementares (Lei No 6.894 de dezembro de 1980, Lei N 7.803 de 18 de julho de 1989, Lei No 9.985 de 18 de julho de 2000, Lei No 9.974 de 6 de junho de 2000, Decreto No 99.556 de 1 de Outubro de 1990, Decreto No 4.340 de 22 de agosto de 2002, Instrução Normativa N 154 de 01 de mar o de 2007, Decreto N 4.074 de 4 de janeiro de 2002, Instrução Normativa N 169/2008, ABNT-NBR10004 2004, Resolução ANVISA RDC 306 - 07 de dezembro de 2004, Resolução No 358, de 29 de abril de 2005) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas posteriores relativos aos assuntos ambientais pertinentes. Também cientes, que apresentaremos todas as declarações e documentos exigidos pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa CEAP-ESALQ se solicitados;
2. Todos os procedimentos, organismos, insumos, equipamentos e quaisquer outros itens que serão utilizados direta ou indiretamente nesta pesquisa serão adquiridos e empregados segundo a legislação/normas dos órgãos competentes;
3. O projeto prevê recursos financeiros, se necessários, para o gerenciamento dos resíduos oriundos da pesquisa;
4. Todo impacto ambiental decorrente da má condução do projeto é de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto;
5. Estamos cientes das normas estabelecidas pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da ESALQ (PGRQ-ESALQ) e comprometemo-nos com o seu cumprimento na sede da instituição responsável pela condução do projeto, colaborando para sua adequada realização;
6. Comprometemo-nos a providenciar, quando exigido em função da natureza do projeto de pesquisa, todos os documentos/autorizações exigidos por órgãos públicos ou privados.

Piracicaba, 29 de outubro de 2024.

Assinam:



Lucas William Mendes
Docente Orientador(a)



Aluna(o)