

MICROBIOMA HUMANO: UMA INTERAÇÃO PREDOMINANTEMENTE POSITIVA?

HUMAN MICROBIOME: A MOSTLY POSITIVE INTERACTION?

ALINE APARECIDA RIBEIRO¹, JOHANNES KUNERT LANGBEHN², NATHALIA ALVES DIAMANTE³, SANDRO AUGUSTO RHODEN⁴, JOÃO ALENCAR PAMPHILE^{4*}

1. Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá; 2. Biólogo, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá; 3. Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá; 4. Professor Doutor do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá.

* Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular e Genética. Avenida Colombo, 5.790, Zona 07, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87020-900. prof.pamphile@gmail.com

Recebido em 14/05/2014. Aceito para publicação em 19/05/2014

RESUMO

Quando falamos em biodiversidade esquecemos que o corpo de todas as espécies animais está literalmente colonizado por uma rica e complexa diversidade de microrganismos. Estas comunidades microbianas são de vital importância para a saúde e estão relacionadas a doenças, e o seu estudo é de suma importância para o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e tratamento de certas patologias. Estudos de genética molecular têm sido empregados para identificação do microbioma humano, assim como a utilização da técnica do DNA Barcode que auxilia na investigação e identificação mais precisa destes microrganismos. Iniciado em 2008, o Projeto Microbioma Humano (HMP) tem por objetivo caracterizar e analisar as comunidades microbianas encontradas em vários locais do corpo humano, sequenciar o genoma microbiano e elucidar a relação entre a doença e as mudanças no microbioma humano. Os pesquisadores, até agora, encontraram alguns resultados interessantes, e com estas descobertas realizadas e os futuros experimentos, o HMP estará auxiliando na melhor compreensão da microbiota endógena humana, no sentido de melhor elucidar suas relações com o hospedeiro e certamente promoverá benefícios para a saúde humana, uma vez que, desenvolve novas estratégias profiláticas, como a aplicação de prebióticos e probióticos.

PALAVRAS-CHAVE: Aspectos ecológicos, genética molecular, microbioma, patologias, saúde humana.

ABSTRACT

When we talk about biodiversity forget that the body of all animal species are literally colonized by a rich and complex diversity of microorganisms. These microbial communities are vitally important to the health and are related to disease, and their study is of great importance for the development of new forms of diagnosis and treatment of certain diseases. Molecular genetic studies have been used to identify the human microbiome, as well as using the technique of DNA barcode that assists in research and more accurate identification of these organisms. Started in 2008, the Human

Microbiome Project (HMP) aims to characterize and analyze the microbial communities found in various parts of the human body, sequenced microbial genomes and elucidate the relationship between the disease and the changes in the human microbiome. The researchers have so far found some interesting results, and the discoveries made, together with the future experiments, the HMP will be helping to better understanding of human endogenous microbiota in order to elucidate its relationship with the host and certainly promote benefits human health as it develops new prophylactic strategies such as the application of prebiotics and probiotics.

KEYWORDS: Ecological aspects, molecular genetics, microbiome, disease, human health.

1. INTRODUÇÃO

Quando falamos em biodiversidade, na maioria das vezes nos lembramos apenas da variedade de plantas e animais que habitam os diferentes ecossistemas no nosso planeta, sejam eles terrestres ou aquáticos. No entanto, nos esquecemos que o nosso corpo e o corpo de outras espécies animais está literalmente colonizado por uma rica e complexa diversidade de microorganismos. O conjunto destes microorganismos, que incluem as bactérias, fungos, vírus e protozoários, no homem denomina-se microbioma humano e, nos animais, microbioma animal¹.

No corpo humano existem aproximadamente 100 trilhões de microorganismos habitando a superfície interna e externa. O microbioma humano varia muito nas mais diversas regiões do nosso corpo, dependendo de condições como umidade, pH, temperatura e nutrientes disponíveis. Sabe-se, por exemplo, que nas regiões mais úmidas e quentes encontram-se uma maior concentração de microorganismos, enquanto que nas regiões mais se-

cas, existe uma quantidade menor deles².

Em muitas espécies de animais, a vida social contribui para a troca de microrganismos benéficos. Estudos demonstraram que no caso de abelhas (*Bombus terrestris*), para o estabelecimento da normalidade da microbiota intestinal, faz-se necessário o contato direto entre as companheiras de ninho ou ingestão de suas fezes. Segundo esses mesmos autores, abelhas que nunca foram expostas às fezes tinham uma microbiota intestinal alterada e eram mais susceptíveis a parasitas³.

O contexto social também molda a criação de associações microbianas de mamíferos. Os chimpanzés de uma mesma comunidade, por exemplo, têm diversidade microbiana mais semelhante do que os chimpanzés de diferentes comunidades⁴.

Vale ressaltar que estas comunidades microbianas são de vital importância para a saúde, e o seu estudo leva a um melhor conhecimento da sua dinâmica complexa, que ainda pode conduzir ao desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e até mesmo de tratamento de certas patologias. Assim, a compreensão de nossa diversidade fisiológica, bem como a de outros animais, passa pelo conhecimento da distribuição destes microrganismos nos diferentes órgãos e seu papel biológico⁵.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizadas as bases de dados NCBI *Pubmed*, *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *Web of Science* (CAPES), utilizando-se as palavras-chave Human Microbiome e Microbiota Humana e artigos publicados a partir do ano 2000. Os artigos de interesse para o presente trabalho foram lidos e analisados criteriosamente.

3. DESENVOLVIMENTO

Durante séculos, o homem só era capaz de investigar micróbios que conseguiam sobreviver em laboratórios. Além disto, os estudos tinham de ser feitos separadamente - frequentemente, com um isolado de cada vez. Mas com o advento de técnicas cada vez mais avançadas de sequenciamento de DNA, já está sendo possível descobrir micróbios que nunca haviam sido detectados antes e observar como eles se comportam em comunidades, mesmo sem a necessidade de cultivo desses microrganismos, o que constitui a Metagenômica.

Técnicas de estudo

Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos⁶. Trata-se de uma técnica de biologia molecular que consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos, e que promove, por meio de etapas de

variação de temperatura, a duplicação de cadeias de DNA *in vitro*. A reação de amplificação de DNA por PCR envolve o emprego dos quatro nucleotídeos do DNA, sequências iniciadoras (primers) e uma DNA polimerase termoestável. Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucleico, a partir de uma fita molde⁷. Esta reação permite a amplificação de qualquer sequência de DNA coletada de amostras de materiais biológicos como sangue, urina, outros fluidos corporais, cabelo e fragmentos teciduais.

Desde a introdução da técnica de PCR, rápidos avanços nas técnicas de genética molecular têm revolucionado a prática da patologia, anatomia e análises clínicas. Resultados dos estudos de genética molecular têm integrado, cada vez mais, os diagnósticos nas análises patológicas e, mais recentemente, têm sido empregados para identificação do microbioma humano e animal⁶.

Sequenciamento genético:

Avanços e perspectivas

O avanço das técnicas moleculares vem permitindo um grande aumento na rapidez, quantidade e complexidade dos dados gerados, mudando o paradigma da genética para uma ciência extremamente rica em dados. Desta forma, o fator limitante tornou-se a análise e a interpretação destes dados, ao invés da geração dos mesmos, sendo necessário o avanço no desenvolvimento de metodologias de análise, ferramentas de bioinformática e estratégias de seleção.

Nos anos 70, obter uma sequência de DNA era um trabalho muito complexo, fosse ele fita simples ou dupla. A análise do DNA era um processo muito mais árduo do que a análise de uma proteína. Além disto, o conhecimento sobre os ácidos nucleicos avançava de forma lenta. No início da década de 80, foi desenvolvida uma técnica de adição de nucleotídeos modificados, chamados dideoxirribonucleotídeos. Estes nucleotídeos modificados impediam o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela DNA polimerase após sua adição. Esta técnica, conhecida como Método de Sanger, consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de DNA a ser sequenciado - cadeias estas que são marcadas radioativamente numa extremidade e diferem entre si por um nucleotídeo. A síntese das cadeias incompletas é conseguida pelo uso de ddNTPs (dideoxirribonucleosídeos trifosfatados), os quais, ao contrário dos dNTPs (desoxirribonucleosídeos trifosfatados), não possuem o grupo 3'-OH. Assim, embora possam ser usados pela DNA polimerase na síntese de cadeias de DNA, não permitem a formação de uma ligação fosfodiéster com outro nucleotídeo trifosfato, pelo que a sua incorporação na cadeia resulta em uma cadeia incompleta⁸. Por separação das cadeias incompletas por meio de eletroforese, pode-se estabelecer a sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA original.

A técnica de sequenciamento genético por eletroforese, aos poucos, foi sendo substituída por métodos cada vez mais automatizados, permitindo o desenvolvimento de sequenciadores automáticos de DNA.

Estudos sistemáticos de genomas completos iniciaram-se com a proposta de utilizar a tecnologia do sequenciamento do DNA para consolidar os dados de mapeamento genético no começo do século XX. Por meio da técnica da construção de mapas genéticos completos dos cromossomos, iniciou-se uma evolução nos estudos na direção de genes individuais e por fim, de todo o repertório gênico de uma espécie.

O sequenciamento de genomas completos permitiu observar que o número de genes diferentes necessários para o desenvolvimento de um organismo complexo como o ser humano, um pouco menos que 27.000 genes⁹, não é muito maior que uma planta dicotiledônea (*Arabidopsis*), em média 25.500 genes¹⁰. Hoje, a tecnologia empregada na análise genômica, alavancou os estudos baseados em sequenciamento do DNA, permitindo a construção de mapas genéticos com marcadores moleculares em poucos dias. Por outro lado, na década de 80, alguns anos seriam necessários para a elaboração destes mesmos mapas genéticos.

A análise do sequenciamento do DNA revolucionou o estudo de várias áreas de pesquisa. Em trabalhos realizados atualmente, é comum a estimativa de árvores filogenéticas em que se relacionam organismos com base na similaridade dos seus genes (DNA Barcode) e não de sua morfologia, aumentando ou diminuindo o grau de parentesco entre muitas espécies. Por outro lado, comparações realizadas entre espécies diferentes são também reveladoras. As comparações evolucionárias entre organismos permitem identificar as sequências que possuem importantes papéis funcionais na estrutura proteica e regulação gênica¹¹, sendo mantidas inalteradas ao longo da evolução dessas espécies. Comparações de sequências irão permitir a identificação de genes considerados essenciais para a distinção e criação de novas espécies.

O Código de Barras de DNA (DNA Barcode)

O Código de Barras de DNA¹² foi proposto em 2003, pelo pesquisador Paul Hebert da Universidade de Guelph, em Ontário, Canadá, como maneira de identificar espécies conhecidas e descobrir novas espécies, utilizando variações em sequências curtas (800 pares de bases) de DNA. Cada espécie estudada por Hebert *et al.*, apresentou uma sequência específica, sendo que essas sequências de DNA em indivíduos da mesma espécie eram idênticas ou muito semelhantes entre si, do que as sequências de outros organismos¹³. A análise de espécies de mesmo gênero revelou que a média da distância máxima entre indivíduos da mesma espécie era de 0,29% e a média da distância mínima entre espécies do mesmo gênero era de 7,05%. Por outro lado, a média geral de

distância máxima entre indivíduos da mesma espécie foi de 0,27%. Com isso, os autores propuseram usar uma divergência mínima de 2,7% (10 vezes maior do que a distância máxima intraespecífica) para diferenciar potenciais espécies¹².

O código de barras de DNA, também conhecido como DNA barcode, consiste na identificação de organismos, possibilitando o diagnóstico de espécies com base em pequenas sequências de DNA. É um método relativamente rápido, viável e de baixo custo, pois permite identificar os organismos de forma objetiva e rigorosa, em diferentes estágios do seu desenvolvimento, na presença ou ausência de estruturas morfológicas distintas e até mesmo quando os organismos se encontram fragmentados. Assim, o código de barras de DNA representa uma ferramenta extremamente promissora para o diagnóstico da biodiversidade, bem como para inúmeros estudos na área da biologia (ecologia, biogeografia e genética). Esta abordagem tem igualmente aplicações diversas em atividades socioeconômicas como, por exemplo: monitorização de espécies invasoras; fiscalização da atividade pesqueira e avaliação de stocks; prevenção de doenças e mesmo na investigação do microbioma humano¹⁴.

Em organismos animais, foi proposto como código de barras uma região de um gene mitocondrial denominado de Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI). O conceito em se utilizar um gene mitocondrial, caracterizou-se nas propriedades apresentadas pelo genoma mitocondrial tais como, ser amplamente distribuído entre os animais, alto número de cópias por célula, apresentar taxa de mutação diferente entre espécies, não sofrer recombinação, ter uma herança predominantemente materna além de possuir baixo polimorfismo ancestral.

Em organismos vegetais ainda ocorre uma divergência na escolha de uma região específica para representar o DNA Barcode. O DNA mitocondrial, como proposto aos organismos animais, não é utilizado devido ao genoma mitocondrial vegetal apresentar baixa variação em sequências, para ser utilizado como código de barras. De acordo com alguns autores, genes ou regiões do genoma específico dos plastídios na região nuclear ITS, parecem ser os candidatos mais promissores¹⁵.

Rhoden *et al.*, estudando a diversidade de fungos endofíticos isolados de plantas em territórios brasileiros, por meio da análise filogenética de sequências de rDNA nas regiões ITS1-5,8S-ITS2, propõem a utilização desta região como o código de barras dos fungos endofíticos. Seus resultados mostraram que mais de 98% das sequências ITS foram satisfatórias para a identificação dos gêneros relacionados no estudo¹⁶.

A utilização da técnica do DNA Barcode em estudos de microbioma irão propor novas medidas de investigação e identificação mais precisos dos microrganismos. Uma vez que podem estar relacionados a possíveis pa-

tologias no organismo humano, aumentando assim, a eficiência no tratamento e corroborando com os estudos do microbioma animal humano.

Projeto Microbioma Humano: o que é?

Iniciado no ano de 2008, o Projeto Microbioma Humano (HMP) tem por objetivo caracterizar as comunidades microbianas encontradas em vários locais do corpo humano, incluindo passagens nasais, cavidade oral, pele, trato gastrointestinal e do trato urogenital, e analisar o papel desses micróbios na saúde humana e nas patologias. O HMP é um projeto de vários anos que envolve vários centros de pesquisa e gera recursos para a comunidade científica promover investigações relacionadas com o microbioma. O resultado é um conjunto de amostras biológicas: 11.174 espécies que representam o microbioma humano, bem como as amostras de sangue correspondentes dos doadores humanos, que estão sendo reservadas para sequenciamento em uma data futura¹⁷.

O HMP inclui as seguintes iniciativas: desenvolvimento de um conjunto de referências de sequências do genoma microbiano e caracterização preliminar do microbioma humano; elucidação da relação entre a doença e as mudanças no microbioma humano; desenvolvimento de novas tecnologias para a análise computacional; exame das implicações éticas, legais e sociais (ELSI) na pesquisa do Microbioma Humano; compreensão do papel do Microbioma Humano na Saúde e em doenças¹⁸. Os pesquisadores, até agora, encontraram alguns resultados interessantes, como: a descoberta de proteínas produzidas por algumas bactérias que vivem no estômago que podem causar ulceração gástrica; descoberta de proteínas associadas com o metabolismo de açúcares e aminoácidos e a descoberta de 14.064 novas proteínas que estão disponíveis no banco de dados do projeto¹⁹.

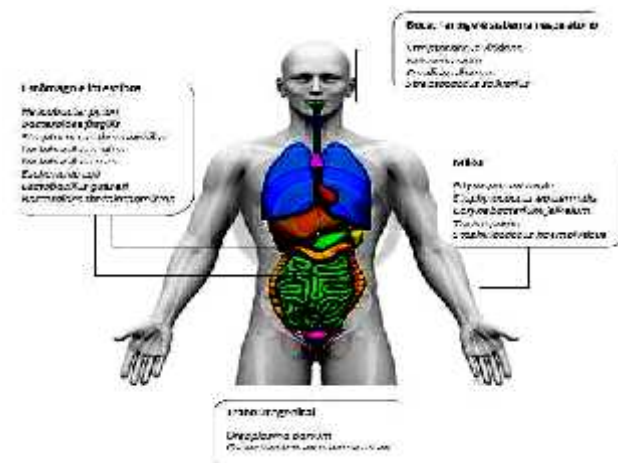
No HMP, são usados e desenvolvidos protocolos de metagenômica que permitem analisar o material genético derivado de completas comunidades microbianas colhidas diretamente do seu ambiente natural, por meio de estudos dos genes ribossomais 16S bacterianos, que distinguem cada organismo pelo seu filo, gênero e mesmo por espécie. A metagenômica apresenta-se como uma ferramenta muito interessante, que, aliada às tradicionais técnicas já existentes na genética, propicia uma análise de cepas bacterianas conhecidas, providenciando informações sobre a complexidade das comunidades microbianas humanas, o que representa um dos objetivos do HMP²⁰. Para isso, o HMP recorre a vários campos da biologia celular, microbiologia, genética e imunologia⁵.

O HMP faz a exploração das comunidades microbianas e a sua relação com o hospedeiro humano por meio da análise do microbioma de indivíduos saudáveis, que são usados como controle, comparando-os com pacientes afetados por algum problema de saúde. A identificação e ditas associações, podem levar ao desenvolvi-

mento de ferramentas com implicações terapêuticas¹⁷.

Com as descobertas realizadas até agora e os futuros experimentos, o HMP estará auxiliando na melhor compreensão da microbiota endógena humana, no sentido de melhor elucidar suas relações com o hospedeiro¹⁹.

O objetivo atual do HMP é a sequência de pelo menos 3.000 genomas bacterianos de referência, de genomas virais e outros adicionais, associados com o corpo humano. Até agora, mais de 800 genomas foram sequenciados e estão disponíveis no National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Data Analysis and Coordination Center (DACC)¹⁷.



Fonte: Adaptado de Rubin²¹

Aspectos ecológicos

O ecossistema microbiano humano desempenha uma variedade de papéis importantes na saúde humana e também em relação às doenças. Cada indivíduo pode ser visto como uma ilha ocupada por assembleias microbianas formadas pelos processos fundamentais da ecologia de comunidades: dispersão, diversificação local, seleção ambiental, e deriva ecológica. A teoria de assembleias de comunidades, e a teoria da metacomunidade em particular, fornece uma estrutura para a compreensão da dinâmica ecológica do microbioma humano. A aplicação criteriosa da teoria ecológica pode levar a melhores estratégias visando restaurar e manter a microbiota, de forma a associar a mesma à saúde. Em uma melhor compreensão, por intermédio da teoria ecológica das assembleias microbianas, poder-se-ia alterar a prática clínica e o tratamento de doenças infecciosas ou desordens inflamatórias crônicas²².

A perspectiva tradicional tem sido pensar o corpo humano como um campo de batalha em que os médicos atacam patógenos com medicamentos. Embora essa perspectiva tenha sido muito bem sucedida para várias doenças, resultou em um grande custo: os danos colaterais podem ser graves. O uso excessivo de antibióticos pode resultar na eliminação de parte do microbioma be-

néfico do indivíduo além da eliminação dos patógenos, e podem aumentar a possibilidade de invasão por organismos indesejáveis²³. A abordagem do corpo como um campo de batalha ignora o contexto da comunidade das doenças infecciosas e inflamação crônica, e não leva em conta o conhecimento crescente sobre a assembleia microbiana humano²⁴.

Dadas as semelhanças ecológicas entre assembleias microbiomas humanas e assembleias de outras comunidades ecológicas, dados sugerem que a medicina humana tem mais em comum com a gestão de um parque do que com estratégia de batalha. Uma compreensão detalhada da importância relativa de diferentes processos de assembleias da comunidade pode ser utilizada para adaptar o tratamento de doenças²⁵.

O que foi feito até agora?

Uma variedade de comunidades microbianas e seus genes (o microbioma) existem em todo o corpo humano, com papéis fundamentais na saúde humana. O National Institutes of Health (NIH), financiando o Consórcio Projeto Microbioma Humano, desenvolveu protocolos metagenômicos que resultaram em uma ampla gama de recursos de qualidade controlada e dados, incluindo métodos padronizados para a criação, processamento e interpretação de diferentes tipos de dados metagenômicos de alto rendimento, disponíveis para a comunidade científica¹⁷.

O Projeto Microbioma Humano utiliza rigorosas normas de boas práticas laboratoriais resultando em um banco de espécimes do microbioma humano, considerado de valor inestimável, considerando-se as possibilidades de estudo e aplicações dos mesmos. Para garantir que as espécies não pertençam a um microbioma perturbado, primeiro os potenciais participantes foram selecionados utilizando-se critérios de exclusão com base no histórico de saúde, incluindo a presença de doenças sistêmicas (por exemplo, hipertensão, câncer, ou imunodeficiência ou desordens autoimunes), na utilização de potencial imunomoduladores e uso recente de antibióticos ou probióticos. Exames físicos subsequentes serviram para excluir indivíduos com base no índice de massa corporal (IMC), lesões cutâneas e saúde oral²⁵.

Com o desenvolvimento do HMP uma variedade de novos protocolos foram desenvolvidos para permitir que um projeto desta envergadura, que incluem métodos de recrutamento de doadores, de laboratório e de processamento de sequências e análise do DNA ribossômico 16S seja realizado. Esses recursos servem como modelos para orientar a elaboração de projetos semelhantes. Estudos com foco principal nas patologias, podem usar esta referência para fins de comparação, incluindo a detecção de mudanças na taxonomia microbiana e perfis funcionais, ou identificação de novas espécies que não estão presentes em corpos saudáveis, mas que aparecem em

condições de doenças²⁶.

A partir de uma população de 242 adultos saudáveis amostradas em 15 ou 18 locais do corpo até três vezes, geraram 5.177 perfis taxonômicos microbianos de genes 16S RNA ribossômico e mais de 3,5 terabases de sequências metagenômicas. Em paralelo, cerca de 800 estirpes de referência, isolados do corpo humano, foram sequenciadas. Coletivamente, esses dados representam o maior recurso que descreve a riqueza e variedade do microbioma humano, proporcionando uma estrutura para estudos atuais e futuros. Coletivamente, os dados representam um tesouro que pode ser extraído para identificar novos organismos, as funções dos genes e redes metabólicas e regulatórias, bem como as correlações entre a estrutura da comunidade microbiana na saúde e em patologias²⁷.

Um catálogo de todos os genomas de referência do HMP está disponível no endereço abaixo, onde é possível filtrar, visualizar gráficos e fazer download:

http://www.hmpdacc-resources.org/hmp_catalog/main.cgi

Além disso, análises comparativas de genomas de referência são fornecidas no endereço:

http://www.hmpdacc-resources.org/cgi-bin/imm_hmp/main.cgi.

As culturas de todas as cepas catalogadas pelo HMP são disponibilizadas ao público por meio do Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository (BEI)¹⁷.

4. CONCLUSÃO

Vários projetos têm sido financiados com o objetivo principal da demonstração do papel do microbioma humano em relação às patologias e a saúde. Estes projetos têm promovido grandes avanços para as pesquisas do HMP, pois desenvolvem ferramentas e tecnologias para o aprimoramento e padronização de protocolos, com o fim de se examinar a relação entre as mudanças no microbioma dos indivíduos e o aparecimento de doenças de relevância para a Medicina.

O HMP pode promover, no futuro, benefícios para a população humana, em função do melhor entendimento da complexa interação dos microrganismos (principalmente bactérias) e o homem e a interação dos microrganismos benéficos com os patogênicos. Assim, tornaria extremamente factível o desenvolvimento e a adoção de novas estratégias profiláticas, como por exemplo, a aplicação de novos prebióticos e probióticos.

REFERÊNCIAS

- [1] Burton GRW, Kirk PGE. Microbiologia para as Ciências da Saúde. 7ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.
- [2] Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 5ª edição. Editora Atheneu, 2008.

- [3] Koch H, Schmid-Hempel P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011; 108:19288.
- [4] Degnanet PH. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2012; 109.
- [5] Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. DNA Cell Biol, 2009; 28(8):405-11.
- [6] Molina AL, Tobo PR. Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico, 2011.
- [7] Costa RJ. Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), 2010.
- [8] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. PNAS. 1977; 74: 5463.
- [9] International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004; 431(7011):931-45.
- [10] Carvalho MCCG, Silva DCG. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. Ciência Rural. 2010; 40(3):735-44.
- [11] Lander ES. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001; 409(6822):860-921.
- [12] Hebert PDN, Stock TS, Zemlank A. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol. 2004; 2:1657-1663.
- [13] Hebert PDN, Cywiska, SL BALL, J R de WAARD. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. Royal Soc Lond. 2003; B 270:313-21.
- [14] Parente M. "O Mar em código de barras: DNA barcoding de organismos marinhos dos Açores". Açoriano Oriental: Biologia, p. 20, 2011.
- [15] Chase MW. The problems with plants: issues and possible solutions. In: First International Scientific Conference on DNA Barcoding. Natural History Museum, London, 2005.
- [16] Rhoden SA, Garcia A, Azevedo JL, Pamphile JA. *In silico* analysis of diverse endophytic fungi by using ITS1-5.8S-ITS2 sequences with isolates from various plant families in Brazil. Genetics and Molecular Reserch. 2013; 12(2):935-50.
- [17] The Human Microbiome Project Consortium. Framework for human microbiome research. Nature. 2012; 486:7402:215-21.
- [18] NIH, National Institutes of Health. Human Microbiome Project. [acesso em 24 de outubro de 2013]. Disponível em: <http://commonfund.nih.gov/hmp/>
- [19] Carmo MS. Microbiota endógena humana e a importância do Projeto Microbioma Humano. Boletim do PET. 2010; 12.
- [20] Janoff EN, Gustafson C, Frank D. The world within: living with our microbial guests and guides. Transl Res. 2012.
- [21] Rubin C. Microbioma humano: 2013. Pré-Univesp. [acesso em 13/05/2014]. Disponível em: <http://www.univesp.ensinosuperior.sp.gov.br/preunivesp/4517/microbioma-humano.html>
- [22] Costello EK. *et al.* The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. Science. 2012; 336:1255-61.
- [23] Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011; 108 (suppl. 1):4554-61.
- [24] Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile* - More difficult than Ever Engl J Med. 2008; 359(18):1932-40.
- [25] Ldederberg J. Infectious History. Science. 2000; 288(5464):287-93.
- [26] Aagaard *et al.* The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. The FASEB journal. 2013; 27:1012-22.
- [27] The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012; 486:207-14.

