

**Daniela Fortunato Teles; Patrícia Luciana de Oliveira ;  
Samuel Geraldo Vale Gonçalves; Thiago Henrique Monteiro**

**Avaliação do efeito do tratamento com Kefir na microbiota e na expressão  
gênica das células epiteliais do intestino de camundongos.**

Projeto apresentado à disciplina  
de Biologia Molecular  
Universidade Federal de Minas Gerais

**Belo Horizonte, 11 de Dezembro de 2007**

## **1. Introdução e Justificativa**

Apesar dos avanços da farmacologia e da biotecnologia no desenvolvimento de drogas novas e potentes para o tratamento de doenças inflamatórias, uma das recomendações da Organização Mundial de Saúde é a de se intensificar a pesquisa na busca de novos produtos naturais. Nossa proposta é a utilização de probióticos conhecidos para avaliação de seus possíveis efeitos benéficos no sistema digestivo e microbiota intestinal de mamíferos.

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que conferem um benefício à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. Além de benefícios à saúde humana, probióticos podem melhorar vários aspectos do crescimento e desempenho em rebanhos e granjas, assim como controlar microrganismos indesejáveis em animais de corte. Estudos indicam que probióticos podem prevenir ou tratar determinadas condições, incluindo doenças atópicas infantis, alergia alimentar, infecção pós-operatória, diarreia aguda e sintomas associados com a síndrome do intestino irritado. Recentemente, real-time PCR e microarranjos tornaram-se métodos proeminentes e promissores para examinar mudanças quantitativas de membros específicos da comunidade microbiana e a influência de probióticos na estrutura e função dos ecossistemas intestinais humano e de animais. Estudos determinaram que apenas uma fração dos organismos presentes nas fezes é cultivável, desta forma, os resultados obtidos através de culturas são limitados. Por outro lado, profundo conhecimento do genoma microbiano permitiu que real-time PCR e microarranjos fossem mais sensíveis, o que resultou em métodos precisos para uma análise abrangente da complexa microbiota intestinal. Além disso, essas tecnologias podem calcular a interferência de microrganismos intestinais no metabolismo do hospedeiro, em seu estado nutricional e doenças.

O kefir, considerado um probiótico, é um produto natural das montanhas do Norte do Cáucaso, onde os primeiros cultivadores o utilizavam com leite de cabra cru, cheio de nata, ou leite de vaca. O leite fresco era despejado em bolsas de couro de cabra, com os Grãos de Kefir e, após 24 horas de fermentação, uma amarração no canto da bolsa retinha quase todos os grãos, permitindo que o Kefir fosse separado e consumido. A bebida resultante era um líquido espumante, cremoso em textura e consistência, com um conteúdo de álcool de aproximadamente 5% a 1%.

A bio-estrutura do grão (uma espécie de bio-matriz) é criada a partir de um relacionamento simbiótico, entre uma vasta mistura de bactérias específicas do ácido láctico e de leveduras.

Apesar de tantas possíveis utilidades, o kefir foi pouco pesquisado no país até hoje e com os estudos concentrados no kefir fermentado no leite. Ele também pode ser produzido em água com açúcar, mas para essa formulação não há pesquisas que comprovam suas ações.

Especialista em fermentados e probióticos, Célia Ferreira classifica o kefir como alimento funcional. Funcional é qualquer alimento ou parte dele que proporcione benefícios à saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças, além de satisfazer os requisitos nutricionais tradicionais.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliação do efeito do tratamento com Kefir na microbiota e na expressão gênica das células epiteliais do intestino de camundongos

### **2.2. Objetivos específicos**

- Quantificar comparativamente material genético de microbiota intestinal de camundongos tratados e não tratados com Kefir, tendo como base *Bifidobacterium* spp, *E. coli*, *C. difficile*, grupo *B. fragilis*, *Lactobacillus* spp e bactérias totais, através de Real-Time PCR.
- Avaliação da expressão gênica de células do epitélio intestinal de camundongos tratados com Kefir por meio de microarranjo

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Animais**

Serão utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, mantidos em gaiolas de plástico, contendo no máximo 5 animais/gaiola. Quando chegam ao biotério, onde são mantidos, os animais são vermifugados (ivermectin 2%).

#### **3.2. Administração do Kefir**

A administração do Kefir já se encontra protocolada. O leite fresco cru, pausterizado ou não, desnatado, semi-desnatado ou integral, é colocado em um recipiente apropriado, limpo, com os grãos de kefir. O conteúdo é deixado à temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. O leite fermentado é coado para separar e recuperar os grãos de kefir do kefir líquido. O leite será administrado por gavagem aos animais com uma dose de 0,2ml.

#### **3.3. Amostras Fecais**

Amostras de fezes dos indivíduos incluídos no estudo serão obtidas por evacuação espontânea após período de 30 dias de tratamento com Kefir do grupo teste. O material será transferido para tubo eppendorf estéril e será processado em, no máximo, 1h.

#### **3.4. Extração de DNA das amostras fecais**

Às amostras de fezes, será adicionado tampão fosfato de sódio 10% p/v (0,1M, pH 6,5), contendo pectina, amido e xilano. O material será homogeneizado em vórtex e centrifugado para remoção de *debris* celular e restos alimentares. O sobrenadante será empregado para extração de DNA, empregando-se kit comercial (Stoll DNA kit, QIAGEN, USA). O DNA será ressuspenso em água quimicamente pura estéril e dosado em espectrofotômetro UV.

### 3.5. Análise microbiológica por Real-Time PCR

O DNA de todas as amostras fecais serão submetidos à análise por Real-Time PCR para *Bifidobacterium* spp, *E. coli*, *C. difficile*, grupo *B. fragilis*, *Lactobacillus* spp e bactérias totais, baseado na seqüência do gene rDNA 16S (sondas e primers estão listados na tabela 1). Para determinação de *Bifidobacterium* spp, amplificadores serão conduzidos num volume total de 50 µL, contendo 1 X TaqMan Universal PCR Máster Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 300 nmol/L de ambos os primers, 150 nmol/L de sonda TaqMan e 20µL de DNA alvo purificado. Para *E. coli*, *C. difficile*, grupo *B. fragilis*, amplificadores serão conduzidos num volume total de 25 µL contendo 1 X TaqMan Universal PCR Máster Mix (Applied Biosystems), 900 nmol/L de ambos os primers, 200 nmol/L de sonda TaqMan e 10 µL de DNA alvo purificado. A amplificação (2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 42 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minutos a 60°C) e detecção serão conduzidos com um sistema de detecção de seqüências Applied Biosystems Prism 7000 (PENDERS et al., 2006).

Para quantificação de lactobacilos e bactérias totais a determinação por Real-Time PCR será realizada com SYBR Greem I (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A PCR para lactobacilos será conduzida num volume total de 25 µL, contendo 1 X iQ SYBR Greem Supermix (Bio-Rad), 500 nmol/L de ambos os primers e 5 µL de DNA alvo purificado. A amplificação será conduzida como a seguir: 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 58°C e 45 segundos a 72°C, com um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Depois da amplificação, análise da curva de anelamento será executada de 60°C para 95°C, com aumento de 0,5°C a cada 10 segundos. Para quantificação da concentração bactérias totais, amplificações foram conduzidas num volume total de 25 µL, contendo 1 X iQ SYBR Greem Supermix (Bio-Rad), 300 nmol/L de ambos os primers e 5 µL de DNA alvo purificado. A amplificação será conduzida por 4 minutos a 95°C e 30 segundos a 60°C, seguidos por 35 ciclos de 30 segundos a 60°C, 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Finalmente, análise da curva de anelamento será executada de 60°C para 95°C, com aumento de 0,5°C a cada 10 segundos. Amplificação, análise da curva de anelamento e detecção serão conduzidos com o MyiQ single-color, sistema de detecção por Real-Time PCR (Bio-Rad) (PENDERS et al., 2006).

**Tabela 1 – Primers e sondas que serão usadas neste estudo**

Organismo Alvo (Tamanho do Amplicon)	Primer/Sonda	Seqüência (5' para 3')	T <sub>m</sub> , °C	Referência
<i>Bifidobacterium</i> spp (126pb)	Forward primer	GCGTGCTAACACATGCAAGTC	59	PENDERS et al., 2005
	Reverse primer	CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	59	
	Sonda	TCACGCATTAATCACCCTTCGCC	70	
<i>E. coli</i> (96pb)	Forward primer	CTAGCCGCGTGTATGAAGAA	59	HUIJSDENS et al., 2002
	Reverse primer	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	59	
	Sonda	TATTAACCTTACTCCCTTCCTCCCGCTGAA	68	
<i>C. difficile</i> (114pb)	Forward primer	TTGAGCGATTTACTTCGGTAAAGA	58	PENDERS et al., 2005
	Reverse primer	TGTACTGGCTCACCTTGATATTCA	59	
	Sonda	CCACGCGTTACTACCCGTCGG	69	
Grupo <i>B. Fragilis</i> (92pb)	Forward primer	CGGAGGATCCGAGCGTTA	58	PENDERS et al., 2006 e LIU et al., 2003
	Reverse primer	CCGCAAACCTTTCACAACCTGACTTA	59	
	Sonda	CGCTCCCTTTAAACCAATAAATCCGG	68	
<i>Lactobacillus</i> spp (341pb)	Forward primer	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	59	RINTTILA et al., 2004, WALTER et al., 2001 e HEILING et al., 2002
	Reverse primer	CACCGCTACACATGGAG	59	
Contagem total (467pb)	Forward primer	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	59	NADKARNI et al., 2002
	Reverse primer	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	58	

T<sub>m</sub>: Indicação da temperatura de anelamento

Referência: PENDERS et al., 2006

### 3.6. Sacrificação e obtenção de células epiteliais do intestino

Os animais serão anestesiados com xilasina (10 mg/Kg) e ketamina (100 mg/Kg) e então sacrificados. Para extração de células epiteliais do intestino, o órgão será retirado, macerado e misturado a 5mL de Percoll 40% (Sigma). Durante 20 minutos será centrifugado a 600xg de forma que as células epiteliais ficam no sobrenadante do colóide de sílica.

### 3.7. Extração de mRNA e obtenção de cDNA

Num tubo de 50mL estéril serão acrescentados aproximadamente  $1 \times 10^8$  células epiteliais do intestino de camundongos e estas serão centrifugadas a 300xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante será desprezado e o *pellet* ressuspenso com 25mL de solução fisiológica estéril. A preparação será novamente centrifugada como descrito anteriormente e o sobrenadante desprezado. Serão então adicionados 15mL do Tampão Desnaturante resfriado a 4°C, homogeneizado por inversão e vortexado por 15 segundos. Para extração do RNA adicionaremos 1,2 mL de Acetato de Sódio 2M em pH 4,0 e a 4°C. A preparação será agitada vigorosamente por inversão e será adicionado ao tubo 12mL de Fenol-Cloroformio a 4°C e, em seguida, homogeneizado novamente por inversão e vortexado por 10 segundos. O tubo ficará em banho de gelo por 15 minutos sendo, em seguida, a mistura transferida para

outro tubo de 50mL e centrifugada a 10.000xg por 20 minutos a 4°C. A fase superior da solução será removida cuidadosamente e transferida para outro tubo de 50mL. A precipitação do RNA total se dá inicialmente pela adição de Isopropanol a 4°C (proporção 1:1 (v/v)). O tubo será incubado a -20°C por 15 minutos. Para resultados otimizados, a precipitação pode seguir *overnight*. Novamente a preparação será centrifugada a 10,000xg por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante será removido e o *pellet* ressuspense em 10mL de Etanol 75% gelado (4°C). Os tubos serão secos e invertidos sobre papel absorvente em fluxo laminar por no máximo 10 minutos. O material será ressuspense em 1mL de água deionizada estéril a 4°C e armazenado a -20°C. Para extração do mRNA, submeteremos o RNA total a separação em coluna cromatográfica por afinidade por oligo-dT.

A fim de analisar de expressão gênica em microarranjo converteremos mRNA em cDNA. Para tanto, utilizaremos 5x tampão – transcriptase reversa para 10 mL: 250 mM Tris HCl pH 8.3 (2.5 mL de 1M), 40 mM MgCl<sub>2</sub> (400 mL de 1M) e 150mM KCl (150 mL de 1M). Será acrescentado 20 mg do RNA total (o que representa aproximadamente 0.2 mg de mRNA), 10 mL 10x mm LV-RT tampão com DTT, 2 ml 0.05 mg de dT15 (oligo dT cujo tamanho é de 15- 18 nucleotídeos), 8-X mL de dH<sub>2</sub>O (i.e volume total é igual a 20 mL). A preparação será aquecida a 90-95°C e rapidamente resfriada em gelo. Em outro tubo serão misturados 20mL do RNA-Dt mix, 2ml 10mM dNTPs (2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 66ml dH<sub>2</sub>O DEPC. Além disso será utilizado 1 mL de inibidor de RNase (esta é uma proteína sensível, requer pelo menos 1mMDTT), 1 ml Transcriptase Reversa. A incubação será por 15 min em temperatura ambiente e 45 min a 45°C

### **3.8. Microarranjo**

Usaremos GeneChip® HT Mouse Genome 430 Array Plate Set (Affymetrix) para avaliação da expressão gênica de células do epitélio intestinal de camundongos tratados com Kefir.



#### 4. Cronograma

Atividade / Período	Jan/08	Fev/08	Mar/08	Abr/08	Mai/08	Jun/08	Jul/08	Ago/08	Set/08	Out/08	Nov/08	Dez/08
Pesquisa Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Obtenção dos animais	X											
Administração do Kefir		X										
Obtenção das amostras fecais			X									
Extração de DNA das amostras fecais			X									
Análise microbiológica por Real-time PCR				X	X	X	X	X				
Sacrificação e obtenção do intestino			X									
Extração de mRNA e obtenção de cDNA				X	X							
Microarranjo						X	X	X				

#### 5. Orçamento

**5.1 Reagentes para RT-PCR para 200 reações:** cerca de US\$ 250,00 (preço informado pelo Doutorando Rodrigo Estevão do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbia ICB/UFMG)

**5.2 Reagentes para purificação de DNA para 100 preps:** cerca de US\$ 220,00 (preço estimado baseado no site: <http://www.chemicell.com/>)

**5.3 Micro-arranjo de 3.918 seqüências:** cerca de US\$ 520,00 dólares sem agregar seqüências mais longas (preço estimado baseado no site: <http://www.lcsciences.com/>)

## 6. Referências bibliográficas

PENDERS, J., VINK, C., DRIESSEN, C., LONDON, N., THIJIS, C., STOBBERINGH, E., Quantification of *Bifidobacterium* spp, *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in fecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;243: 141-147

PENDERS, J., THIJIS, C., VINK, C., STELMA, F.F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DEN BRANDT, P. A., STOBBERINGH, E. E., Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *PEDIATRICS.* 2006;118: 511-521

CAREY, C.M., KIRK, J.L., OJHA, J., KOSTRZYNSKA, M., Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Can. J. Microbiol.* 2007;53: 537-550

HUIJSDENS, X.W., LINSKENS, R.K., MAK, M., MEUWISSEN, S.G., VANDENBROUCKE GRAULS, C.M., SAVENLKOU, P.H., Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40: 4423-4427

RINTTILA, T., KASSINEN, A., MALINEN, E., KROGIUS, L., PAIVA, A., Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in fecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 2004;97: 1166-1177

NADKARNI, M.A., MARTIN, F.E., JACQUES, N.A., HUNTER, N., Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology.* 2002;148: 257-266

LIU, C., SONG, Y., MCTEAGUE, M., VU, A.W., WEXLER, H., FINEGOLD, S.M., Rapid identification of the species of the *Bacteroids fragillilis* group by multiplex PCR assays using group - and species - specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003;222: 9-16

WALTER, J., HERTEL, C., TANNOCK, G.W., LIS, C.M., MUNRO, K., HAMMES, W.P., detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67: 2578-2585

HEILIG, H.G.H.J., ZOETENDAL, E.G., VEUGHAN, E.E., MARTEAU, P., AKKERMANS, A.D.L., DE VOS, W.M., Molecular diversity of *Lactobacillus* spp and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68: 114-123

## **7. Parecer das apresentações**

### **7.1 - Grupo 1 – Técnica do PRO-DRUG combinando o adHSVtk e a droga GVC como uma estratégia para a terapia gênica**

**7.1.1 - Proposta:** O projeto procura expandir a técnica HSV-TK/GCV usada eficientemente na maioria dos casos de combates a tumores cerebrais para outros tipos recorrentes de tumores de modo a obterem-se novas alternativas para o tratamento do câncer.

**7.1.2 - Relevância:** Trata-se de um projeto relevante uma vez que a técnica HSV-TK/GVC tem tido uma grande aplicabilidade nos casos de tratamento de tumores cerebrais. Dessa forma, uma possível expansão dessa técnica a outros tipos de tumores, como proposto pelo projeto, significaria, incontestavelmente, um grande avanço nos estudos relacionados ao combate ao câncer. A relevância desse projeto fica ainda destacada quando consideramos os níveis crescentes de ocorrência de câncer na população mundial e a importância das terapias gênicas, tais como a técnica HSV-TK/GVC, no tratamento dessa doença.

**7.1.3 - Viabilidade:** O projeto é viável, apresentando no decorrer de sua metodologia métodos há muito utilizados tais como o Western Blot, Eletroforese de campo pulsátil e microarranjo.

### **7.2 - Grupo 2 – 'Biomol: Grupo 2 - "Estudo sobre a variação da expressão da HBD-2 e HBD-3 em queratinócitos expostos ao fungo *Malassezia furfur*"**

**7.2.1 - Proposta:** O projeto propõe avaliar a expressão de hBD-2 e hBD-3 em queratinócitos expostos ao fungo *Malassezia Furfur*.

**7.2.2 - Relevância:** O projeto, a nosso ver, propõe um estudo de grande importância. Isto porque, através dele poderemos compreender com mais clareza o mecanismo de ação da hBD-2 e hBD-3 nos queratinócitos e, assim, formular hipóteses que explicariam o porquê de, mesmo estas sendo moléculas microbicidas, tais células ainda estão sujeitas à micoses. Além

disso, a avaliação da expressão dessas substâncias expostas ao fungo poderiam sugerir mecanismos eficazes para o tratamento de micoses.

**7.2.3 - Viabilidade:** é viável, uma vez os protocolos pareceram confiáveis, simples e condizentes com o que o projeto propõe. Dessa forma, provavelmente o grupo terá sucesso em seu trabalho.

### **7.3 - Grupo 3 – Transcrição gênica de RNA mensageiro ligados a tigmomorfogênese em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)**

**7.3.1 - Proposta:** verificar expressão de genes envolvidos no aumento do crescimento apical e diminuição do radial de *Arabidopsis* submetidas a estresse mecânico (vento).

**7.3.2 - Relevância:** projeto relevante, sobretudo sob o aspecto comercial (como sugerido pelo próprio grupo na apresentação). Uma vez sabendo quais genes são silenciados e quais são expressados, aqueles que têm madeira como matéria-prima podem usar deste artifício para obter troncos mais lenhosos ou mais ramificados. Excluindo-se esta ótica financeira, o projeto tem relevância também no campo da ecologia, pois a partir deste conhecimento da expressão gênica um reflorestamento de áreas sob diferentes condições climáticas torna-se mais viável.

**7.3.3 - Viabilidade:** projeto simples utilizando técnicas rotineiras em laboratório e com custo relativamente baixo. O uso de *Arabidopsis* pode ser considerado um ponto a favor devido ao fácil cultivo, pequeno tamanho e seqüenciamento conhecido.

### **7.4 - Grupo 4 – Eucalipto transgênico para recuperação de áreas contaminadas por metais pesados**

**7.4.1 - Proposta:** produzir um OGM (organismo geneticamente modificado), no caso um eucalipto híbrido de duas espécies, em que se detectou a presença de fitoquelatinas, peptídeos capazes de quelar e armazenar metais pesados em vesículas, de forma que estes não possam danificar a estrutura vegetal. O eucalipto transgênico teria a expressão de

fitoquelatinas aumentada com o intuito de ser utilizado para recuperação de solos contaminados com determinados metais pesados.

**7.4.2 - Relevância:** é um projeto relevante, já que apresenta uma possível solução a regiões que apresentam contaminação por metais pesados para as quase ainda não há alternativas eficazes de restauração.

**7.4.3 - Viabilidade:** é uma proposta interessante e bastante ousada, pois tanto o método de produção do organismo transgênico e a fase de experimentação do mesmo podem durar longo tempo. Deve-se ter em vista também os possíveis efeitos ecológicos de um OGM que acumule metais pesados em sua estrutura, como a magnificação trófica.

## **7.5 - Grupo 5 – Aspectos Peculiares da Leucemia em Crianças com Síndrome de Down**

**7.5.1 - Proposta:** análise da possível diferença na expressão gênica, através de comparação do proteoma de medula óssea, de crianças leucêmicas portadoras de síndrome de Down e normais levando-se em consideração que crianças com a trissomia do cromossomo 21 têm 20% mais chance de desenvolverem leucemia (sobretudo do tipo megacarioblástica aguda ou mielóide aguda).

**7.5.2 - Relevância:** projeto com relevância considerável. A comparação entre os quatro primeiros grupos usados trará consistência à hipótese levantada e poderá apontar uma razão pela qual existe uma maior susceptibilidade de crianças com síndrome de Down desenvolverem este tipo de leucemia com uma frequência maior do que a apresentada em crianças normais. Entretanto um ponto que pareceu falho é a utilização de quimioterápico para avaliar seus efeitos no tratamento em um grupo de leucêmicos com trissomia (grupo V), mas não há um “grupo VI” de leucêmicos sem trissomia submetidos ao mesmo tratamento para que se faça a comparação.

**7.5.3 - Viabilidade:** viável embora possa apresentar como fator complicador o recrutamento de voluntários. Sobre as técnicas utilizadas parece não haver problemas pois

tratam-se de técnicas já utilizadas com certa frequência nos laboratórios de biologia molecular.

## **7.6 - Grupo 6 – Determinação e comparação da expressão gênica entre endométrios normais, hiperplásicos e com endometriose.**

**7.6.1 - Proposta:** o projeto propõe a comparação da expressão gênica entre células do endométrio de mulheres férteis, de mulheres com infertilidade portadoras de endometriose e portadoras de Hiperplasia Endometrial a fim de, posteriormente, se fazer a identificação de possíveis genes com padrões diferentes de expressão em cada um desses casos. O entendimento desses diferentes padrões seria uma ferramenta a mais no entendimento das causas da infertilidade feminina.

**7.6.2 - Relevância:** trata-se de um projeto relevante já que, ainda que a relação entre endometriose e Hiperplasia Endometrial com a infertilidade seja incerta, tem-se uma possível ligação entre essas doenças que acometem o útero e a ocorrência de infertilidade nas mulheres. Dessa forma, o reconhecimento das diferenças de expressões gênicas em células do endométrio de mulheres férteis, mulheres com Endometriose e Hiperplasia Endometrial pode, de fato, auxiliar na compreensão das causas da infertilidade favorecendo os estudos relacionados ao seu tratamento.

**7.6.3 - Viabilidade:** o projeto é viável embora possa apresentar alguns pontos complicadores, tais como: o recrutamento de voluntárias que estivessem, primeiro, dispostas a submeterem-se a uma ultra-sonografia transvaginal e que, além disso, possuíssem um ciclo menstrual regular já que a biopsia do endométrio seria realizada no 21º dia do ciclo e sete dias após a ovulação. Contudo, tais complicadores não inviabilizam o projeto.

## **7.7 - Grupo 8 – Construção de bactérias verdes fluorescentes para uso didático**

**7.7.1 - Proposta:** produzir bactérias da espécie *Escherichia coli* com o gene para síntese de pigmento fluorescente derivado de algas, para fins didáticos como demonstração de processos biológicos em microrganismos.

**7.7.2 - Relevância:** é um projeto simples, porém bastante interessante e muito útil. Microrganismos que expressem o gene de fluorescência usados para fins didáticos em escolas seriam muito instrutivos e enriquecedores para a formação científica dos estudantes dos ensinos fundamental, médio e também superior.

**7.7.3 - Viabilidade:** o projeto apresenta proposta simples e demanda métodos bastante difundidos no meio científico, de fácil acesso e que exigem investimentos não muito altos. Portanto, bastante viável.