



ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS COM CAQUEXIA E PORTADORES DE TUMOR POR MEIO DA INDUÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS LLC (*Lewis Lung Carcinoma*)

Ana Carolina Humberto¹; Yara Natércia Lima Faustino de Maria², David Aciole Barbosa³, Fabiano Bezerra Menegidio⁴, Luiz R. Nunes⁵, Daniela Leite Jabes⁶

1. Estudante - curso de Ciências Biológicas; e-mail: anacarol.dracarys@gmail.com;
2. Estudante de Doutorado em Biotecnologia – UMC; e-mail: yaralima07@gmail.com;
3. Estudante de Doutorado em Biotecnologia - UMC; e-mail: aciole.d@gmail.com;
4. Professor - UMC; e-mail: fabianomenegidio@umc.br;
5. Professor Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – UMC; e-mail: nunes1212@gmail.com;
6. Professora - UMC; e-mail: danielajabes@umc.br.

Área do Conhecimento: Genética Molecular, Microbiologia.

Palavras-Chave: Caquexia; Microbioma; Microbiota, NGS, Bioinformática.

INTRODUÇÃO

Ao longo de sua evolução, os seres humanos desenvolveram diversas relações ecológicas simultâneas com microrganismos de todos os domínios biológicos (Bactéria, Eukariota, Arquea), os quais juntos compõem seu microbioma (ou microbiota). De todos os nichos corporais humanos, o trato gastrointestinal (GI) é o órgão mais densamente colonizado por eles. Sabe-se que os representantes da microbiota intestinal desempenham um papel importante nos processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos do corpo humano (MILANI *et al.*, 2017; ROWAN-NASH *et al.*, 2019), trazendo-lhe diversas contribuições para a saúde. No entanto, quando o equilíbrio da comunidade de microrganismos (eubiose) é interrompido no hospedeiro, ocorre o que chamamos de disbiose, que pode causar e/ou agravar diferentes tipos de doenças (PETERSEN; ROUND, 2014). Além disso, destacamos que a microbiota intestinal já foi associada a diferentes distúrbios metabólicos como a caquexia associada ao câncer, síndrome metabólica que causa redução de massa muscular, depleção de estoques de gordura e quadro de inflamação crônica generalizada em humanos (BATISTA *et al.*, 2016). Diversos estudos já correlacionaram o desenvolvimento de caquexia com disbioses envolvendo agentes fúngicos (JABES *et al.*, 2020) e bacterianos no trato GI (BINDELS *et al.*, 2016; NI *et al.*, 2021; PÖTGENS *et al.*, 2021, DE MARIA, 2021). Diante dessas perspectivas, nosso grupo de pesquisa iniciou um amplo estudo com o intuito de determinar e comparar a composição da microbiota intestinal de camundongos da linhagem C57BL/6 durante o desenvolvimento de caquexia induzida por transplante tumoral subcutâneo, com células tumorais da linhagem LLC (*Lewis Lung Carcinoma*), de maneira a identificar a ocorrência de disbioses nos mesmos e sua relação com o quadro de saúde dos animais por meio de análises *in silico*.



OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo realizar uma caracterização das alterações que ocorrem na microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 identificados como CC (caquéticos), TB (portadores de tumor) e SC (sem inoculação tumoral), durante o desenvolvimento de caquexia induzida por transplante tumoral subcutâneo, com células tumorais da linhagem LLC (*Lewis Lung Carcinoma*). Para tanto, foram conduzidas: (i) análises de diversidade da população bacteriana identificada nos grupos CC, TB e SC com o auxílio da ferramenta *MicrobiomeAnalyst* (CHONG *et al.*, 2020) e (ii) identificação dos principais táxons bacterianos prevalentes em suas populações por meio das análises de LEfSe (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*) (SEGATA *et al.*, 2011).

METODOLOGIA

Análises de alfa e beta diversidade foram conduzidas com o auxílio da ferramenta *MicrobiomeAnalyst* (CHONG *et al.*, 2020), utilizando as Tabelas de OTU que já haviam sido geradas por nosso grupo de pesquisa a partir do processamento das sequências de bibliotecas de *amplicons* do gene 16S rDNA bacteriano. Detalhes sobre esse fluxo de trabalho podem ser encontrados em de Maria *et al.* (2021). Para as análises de diversidade, os dados carregados foram submetidos ao filtro de abundância (*Low Count Filter*) ajustado para valores mínimos enquanto as Tabelas de OTU foram rarefeitas pelo número de sequências da menor biblioteca, em cada caso (*Rarefy to the Minimum Library Size*), não sendo realizado “*Data Scaling*” no conjunto de dados. A significância estatística referente às diferenças da alfa diversidade foi verificada por teste-t ($p < 0,05$) e as diferenças de beta diversidade foram calculadas com a métrica de Bray-Curtis, sendo visualizadas pelo algoritmo de NMDS, seguido de validação estatística através de análise de PERMANOVA e PERMDISP ($p < 0,05$). Para as análises de LEfSe, uma microbiota central (*Core*) foi definida para cada grupo (SC, CC e TB) separadamente, reunindo apenas OTUs presentes em, pelo menos, 70% dos animais de cada grupo em questão, conforme descrito por Jabes *et al.* (2020). Esta estratégia é frequentemente usada para reduzir os efeitos relacionados à variabilidade individual entre os sujeitos, minimizando o efeito dos táxons que estão super-representados em poucos indivíduos dentro de um grupo, mas não estão consistentemente presentes em todo o grupo. As Tabelas de OTU *Core 70*, feitas para os dados de 16S, foram então submetidas ao script *summarize_taxa.py*, integrando os resultados obtidos para cada táxon e convertendo suas prevalências absolutas em proporções relativas. Estas tabelas relativas foram submetidas a análises de LEfSe, utilizando as configurações padrão da ferramenta Galaxy LEfSe. O LEfSe permite identificar táxons microbianos diferencialmente representados entre amostras de microbioma com base em seus dados de abundância, podendo também gerar cladogramas filogenéticos referentes aos microrganismos detectados (SEGATA *et al.*, 2011). Todas as figuras referentes aos nossos resultados foram adicionadas no repositório virtual OSF (<https://osf.io/jbavq/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo os resultados das análises verificada na uniformidade da microbiota dos três grupos experimentais (medida pelo Índice de Simpson) nos níveis hierárquicos de ordem à espécie. Com relação às análises de diversidade beta, efetuadas com auxílio de um algoritmo Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) e utilizando o índice de Bray-Curtis com teste PERMANOVA, observamos diferenças estatisticamente



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

significativas ($p < 0,005$) entre as microbiotas de SC, CC e TB à nível de OTU. Além disso, constatamos que essa variação não deriva de diferenças na dispersão de amostras, de acordo com os resultados do teste de PERMDISP ($p = 0.92375$) realizado em conjunto com esses dados - o que indica que tais resultados poderiam ser atribuídos à diferença na composição da microbiota dos três grupos. Em seguida, de maneira a identificar os principais taxa bacterianos diferencialmente representados nos grupos CC, SC e TB, realizou-se uma análise com auxílio da plataforma *MicrobiomeAnalyst*. Como resultado, identificamos que a microbiota intestinal dos três grupos de camundongos é composta principalmente por representantes de 9 filos bacterianos: Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Deferribacteres, Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, TM7 e Verrucomicrobia, sendo Bacteroidetes o mais representativo entre todas as amostras, em concordância com estudos anteriores sobre a composição da microbiota intestinal normal de seres humanos (MILANI *et al.*, 2017) e com comparações prévias realizadas pelo nosso grupo (DE MARIA *et al.*, 2021) entre camundongos SC e CC. Além disso, nossos achados mostram que há expansão de representantes dos filo Proteobacteria e Cyanobacteria, da família Lachnospiraceae e da espécie *Akkermansia muciniphila* na microbiota intestinal do grupo CC. No grupo SC, há maior abundância dos filos Bacteroidetes e Verrucomicrobia e das famílias Pasteurellaceae e Moraxellaceae. Já no grupo TB, analisado pela primeira vez no contexto da microbiota intestinal da caquexia associada ao câncer, há maior abundância do filo Firmicutes e predominância exclusiva de Tenericutes e das famílias Erysipelotrichaceae e Mycoplasmataceae em sua microbiota intestinal.

Comparando-se esses resultados com as análises conduzidas por de Maria *et al.* (2021) em animais SC e CC, observamos que *Ruminococcus gnavus*, *Clostridium methylpentosum* e os gêneros *Coprococcus sp.* e *Oscillospira sp.*, táxons pertencentes a classe Clostridia (filo Firmicutes) também são super-representados na microbiota intestinal de camundongos CC em sua pesquisa. Visto que em ambos os grupos inoculados com células LLC, a saber, CC e TB, há expansão desses grupos bacterianos, sugerimos que há uma possibilidade de que tais táxons clostridiais correlacionem-se com a presença do tumor. No entanto, mais estudos mais devem ser conduzidos para se verificar se, de fato, tais bactérias podem ser associadas com o fenótipo cancerígeno e/ou caquético. Os resultados de todas as análises aqui mencionadas podem ser visualizados em <https://osf.io/jbavq/>.

CONCLUSÃO

Os estudos desenvolvidos neste trabalho permitiram detectar diversos aspectos inéditos acerca da disbiose bacteriana observada durante o desenvolvimento tumoral em camundongos com e sem caquexia. Assim, nossos resultados estabelecem um importante padrão de referência para pesquisas futuras visando caracterizar a correlação entre o microbioma e o desenvolvimento de câncer e caquexia.

REFERÊNCIAS

BATISTA JR, Miguel L. et al. Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 7, n. 1, p. 37-47, 2016

**REVISTA CIENTÍFICA DA UMC**

BINDELS, Laure B. et al. Synbiotic approach restores intestinal homeostasis and prolongs survival in leukaemic mice with cachexia. **The ISME journal**, v. 10, n. 6, p. 1456-1470, 2016.

CHONG, Jasmine et al. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. **Nature Protocols**, v. 15, n. 3, p. 799-821, 2020.

DE MARIA, Yara et al. Analysis of mouse faecal dysbiosis, during the development of cachexia, induced by transplantation with Lewis lung carcinoma cells. *Microbiology*, v. 0. p. 1-13, 2021.

JABES, Daniela L. et al. Fungal Dysbiosis Correlates with the Development of Tumor-Induced Cachexia in Mice. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 364, 2020.

MILANI, Christian et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 81, n. 4, p. e00036-17, 2017.

NI, Yueqiong et al. Distinct composition and metabolic functions of human gut microbiota are associated with cachexia in lung cancer patients. **The ISME Journal**, p. 1-14, 2021.

PETERSEN, Charisse; ROUND, June L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1024-1033, 2014.

PÖTGENS, Sarah A. et al. Multi-compartment metabolomics and metagenomics reveal major hepatic and intestinal disturbances in cancer cachectic mice. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 12, n. 2, p. 456-475, 2021.

SEGATA, Nicola et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome biology**, v. 12, n. 6, p. 1-18, 2011.