



## 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 Humberto<sup>1</sup>; Yara Natércia Lima Faustino de Maria<sup>2</sup>, David Aciole Barbosa<sup>3</sup>, Fabiano Bezerra Menegidio<sup>4</sup>, Regina Costa de Oliveira<sup>5</sup>; Luiz R. Nunes<sup>6</sup>, Daniela Leite Jabes<sup>7</sup>

1. Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: anac.humberto@gmail.com;
2. Doutoranda em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: yaralima07@gmail.com;
3. Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: aciole.d@gmail.com;
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabianomenegidio@umc.br;
5. Professor orientador do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: nunes1212@gmail.com
6. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br;
7. Coordenadora do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br.

**Área do Conhecimento:** Genética Molecular e de Microrganismos

**Palavras-Chave:** Bioinformática; Câncer; Caquexia; Microbioma.

### INTRODUÇÃO

O microbioma intestinal humano é representado por diversos táxons fúngicos presentes no trato gastrointestinal (GI), sendo este o órgão mais densamente colonizado por esses microrganismos. Sabe-se que os fungos desempenham um papel importante nos processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos do corpo humano, podendo trazer diversas contribuições para sua 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 (HUSEYIN *et al.*, 2017; THOMAS *et al.*, 2017). Dentre elas, destacamos a caquexia associada ao câncer, síndrome que causa redução de massa muscular, depleção de estoques de gordura e quadro de inflamação crônica generalizada em humanos (BATISTA *et al.*, 2016), e que já foi correlacionada com o desenvolvimento disbioses intestinais envolvendo diferentes agentes fúngicos (JABES *et al.*, 2020) e bacterianos (BINDELS *et al.*, 2016; NI *et al.*, 2021; DE MARIA *et al.*, 2021; PÖTGENS *et al.*, 2021). Diante dessas perspectivas, nosso grupo de pesquisa iniciou em 2017 um amplo estudo com o intuito de determinar e comparar a composição da microbiota, microbiota e viroma 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*. Os resultados iniciais de nossas pesquisas foram publicados recentemente nos artigos de Jabes *et al.* (2020) e de Maria *et al.* (2021), onde detectamos diferenças significativas no perfil da microbiota e

microbiota de camundongos saudáveis (SC) e caquéticos (CC). No trabalho aqui apresentado, buscamos complementar os resultados desses estudos incluindo, pela primeira vez, dados de um novo grupo experimental de camundongos portadores de tumor (TB) sem caquexia (Figura Suplementar 1), com o intuito de identificar o perfil da micobiota desses animais e compará-lo aos grupos SC e CC.

## OBJETIVOS

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

## METODOLOGIA

O material extraído do DNA genômico total das amostras de fezes dos camundongos controles (SC, n = 8), caquéticos (CC, n = 8) e portadores de tumor (TB, n = 8) foi utilizado para amplificar sequências da região espaçadora interna 1 (ITS1), conforme descrito por Jabes *et al.* (2020). Essas sequências de *amplicons* ITS1 brutas foram processadas por uma *pipeline* customizada para o QIIME v. 1.9.1, desenvolvida especificamente em nosso laboratório ([https://osf.io/5fxgn/?view\\_only=550b805d24a242aba95e934959d383bd](https://osf.io/5fxgn/?view_only=550b805d24a242aba95e934959d383bd)). Resumidamente, os *paired-end reads* individuais foram unidos e os *amplicons* resultantes foram verificados quanto à sua qualidade e filtragem usando ferramentas de pré-processamento do pacote QIIME v. 1.9.1. Essas sequências foram processadas para construir uma tabela de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) pela estratégia de OTU *picking*, sendo a Tabela OTU resultante filtrada para manter apenas OTUs com abundância acima de 0.00001. Para as análises de diversidade, os dados carregados foram submetidos ao filtro de abundância (*Low Count Filter*) ajustado para valores mínimos (*Minimum Count* = 0 e *Prevalence in Sample* = 10) e as Tabelas de OTU foram rarefeitas pelo número de sequências da menor biblioteca, em cada caso (*Rarefy to the Minimum Library Size*). 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 ( $p < 0,05$ ). 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 com *core* 70 feitas para os dados de ITS1 foram então submetidas ao script *summarize\_taxa.py*, integrando os resultados obtidos para cada táxon e convertendo suas prevalências absolutas em proporções relativas. Em seguida, as tabelas relativas foram submetidas a análises de LEfSe, utilizando as configurações padrão da ferramenta no Galaxy Huttenhower. Através desse software, pode-se detectar biomarcadores de alta dimensionalidade que identificam características genômicas (genes, vias metabólicas e taxa), caracterizando as diferenças entre duas ou mais condições biológicas. Além disso, 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 citadas no corpo deste texto, referentes aos resultados de nossas análises, foram adicionadas como material suplementar no repositório virtual OSF através do link [https://osf.io/kyvs9/?view\\_only=](https://osf.io/kyvs9/?view_only=).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após processarmos a Tabela de OTUs gerada pelo QIIME v. 1.9.1 na plataforma *MicrobiomeAnalyst*, identificamos um total de 1133 OTUs distribuídas entre os camundongos SC, TB e CC. Esta Tabela OTU (em formato BIOM) foi usada para avaliar variações nas diversidades alfa e beta das populações fúngicas intestinais dos camundongos SC, TB e CC. A alfa diversidade resume tanto a riqueza de espécies (número total de observações) e/ou uniformidade (distribuição da abundância entre as espécies) dentro de uma amostra e diferentes índices podem ser usados para calculá-la (CHONG *et al.*, 2020). Segundo os resultados da análise de alfa diversidade (Figura Suplementar 2), utilizando o índice Observado, que calcula o número total de representantes por amostra, observou-se que não há diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) na riqueza populacional fúngica de SC, TB e CC nos níveis taxonômicos de espécie e OTUs. Além disso, nenhuma variação foi verificada na uniformidade da microbiota dos três grupos experimentais analisando-se outros níveis hierárquicos (gênero à filo) ou índices de alfa diversidade (Simpson, Shannon, ACE, Chao1, Fisher). Em relação à análise de diversidade beta (Figura Suplementar 3), efetuadas com auxílio de um algoritmo *Non-Metric Multidimensional Scaling* (NMDS) e utilizando o índice de Bray-Curtis com teste PERMANOVA, observamos que também não há diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,005$ ) entre as micobiotas de SC, CC e TB à nível de OTU,

nem em nenhum outro nível taxonômico (espécie à filo) - o que indica que a composição da microbiota dos três grupos, neste caso, não é suficientemente heterogênea a ponto de ser considerada um fator de distinção entre eles. Neste sentido, prosseguimos nossa investigação buscando identificar os principais táxons fúngicos que compõem a microbiota intestinal de SC, TB e CC, gerando um gráfico onde exibe-se o perfil de abundância taxonômica dentro de cada grupo através da plataforma *MicrobiomeAnalyst*. Como resultado, identificamos que a microbiota intestinal dos três grupos de camundongos é composta principalmente por representantes de 4 filos fúngicos (Figura Suplementar 4): Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota e Mucoromycota. Com a exceção de Glomeromycota, todos esses filos também demonstraram ser superabundantes na microbiota de camundongos SC e CC em análises anteriores conduzidas por Jabes *et al.*, 2020. Ademais, para complementar os testes de diversidade conduzidos neste estudo, buscamos averiguar se algum táxon fúngico específico apresenta-se super ou sub representado na microbiota de SC, TB e CC por meio de análises de LEfSe, uma ferramenta amplamente utilizada para identificar biomarcadores diferencialmente representados em dados de microbioma (SEGATA *et al.*, 2011). A análise foi realizada com uma Tabela OTU com *core* 70, ou seja, contendo apenas OTUs presentes em pelo menos 70% dos animais de cada grupo experimental, conforme descrições da metodologia. Através dessa análise, constatou-se que quando comparados os dados de TB x SC e SC x CC, não foram observadas diferenças na representação de nenhum táxon fúngico na microbiota dos grupos experimentais analisados. Apenas ao compararmos os dados de TB com CC, identificamos que o gênero *Penicillium* parece estar super-representado na microbiota de TB (Figura Suplementar 5). Interessantemente, esta é a única bioassinatura distintiva entre o perfil da microbiota de TB e CC encontrada em todas as nossas análises. Dessa forma, nossos dados novamente mostram que a microbiota de SC, TB e CC parece apresentar pouca variação, sendo o único fator diferencial entre suas populações fúngicas a expansão de *Penicillium* em TB em relação a CC, táxon que também demonstra ser super-representado em animais SC conforme estudos prévios conduzidos por Jabes *et al.* (2020). Sabe-se que fungos do gênero *Penicillium* são capazes de produzir diversos extrólitos (metabólitos secundários secretados para o meio extracelular) com propriedades antitumorais, tais como OMF (3-O-methylfunicone) e benzofenonas, por exemplo. Além disso, alguns compostos derivados de cromonas e metabólitos como lactonas, alcalóides azafilonas entre outros produzidos por *Penicillium* possuem propriedades anti-inflamatórias relevantes no tratamento de diferentes doenças inflamatórias e neurodegenerativas (TELES *et al.*, 2020). Assim, considerando esses fatores, sugere-se que os metabólitos anti-inflamatórios de *Penicillium* poderiam contribuir para a manutenção da homeostase intestinal dos camundongos TB, atuando como um fator potencial de proteção contra a caquexia neste grupo experimental.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises de dados de sequenciamento de ITS1 conduzidas neste estudo, constatou-se pela primeira vez que o perfil da microbiota intestinal de camundongos inoculados com célula LLC com e sem caquexia e controles saudáveis é taxonômica e populacionalmente semelhante, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre eles em relação à sua alfa e beta diversidade. Os principais táxons que compõem a microbiota de SC, TB e CC são representados pelos filos Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota e Mucoromycota. Ademais, através de análises de LEfSe, constatou-se que o único grupo fúngico super-representado em TB em comparação com CC é o gênero *Penicillium*, que possui a capacidade de produzir diversos metabólitos com propriedades anti-inflamatórias relevantes no tratamento de doenças inflamatórias. Conforme esses dados sugerem, a expansão de *Penicillium* na microbiota intestinal de camundongos TB poderia representar um fator de proteção potencial contra caquexia em animais portadores de tumor.

## 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
- BINDELS, Laure B. *et al.* Symbiotic 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 NLF *et al.* Analysis of mouse faecal dysbiosis, during the development of cachexia, induced by transplantation with Lewis lung carcinoma cells. **Microbiology**, v. 167, n. 10, p. 001088, 2021.
- HUSEYIN, Chloe E. *et al.* Forgotten fungi—the gut mycobiome in human health and disease. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 4, p. 479-511, 2017.
- 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.
- 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.
- 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.
- TELES, Amanda Mara *et al.* Marine-derived *Penicillium purpurogenum* reduces tumor size and ameliorates inflammation in an Erlich mice model. **Marine drugs**, v. 18, n. 11, p. 541, 2020.
- THOMAS, Sunil *et al.* The host microbiome regulates and maintains human health: a primer and perspective for non-microbiologists. **Cancer research**, v. 77, n. 8, p. 1783-1812, 2017.