

PADRONIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS COM VISTAS A ANÁLISE DE MICROBIOMA/MICOBIOOMA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA CAQUEXIA INDUZIDA POR TRANSPLANTE DE CÉLULAS LLC

Yara Natércia Lima Faustino de Maria¹; Regina Costa de Oliveira²; Luiz R. Nunes³; Daniela Leite Jabes⁴

1. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: yaralima07@gmail.com
2. Professor; e-mail: reginaco@umc.br
3. Professor; e-mail: nunes1212@gmail.com
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br

Área do Conhecimento: **Genética Molecular, Microbiologia.**

Palavras-Chave: Caquexia; Microbioma; Micobioma.

INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome metabólica associada a diversas doenças, como câncer, doença renal crônica, doenças cardíacas crônicas, entre outras enfermidades, sendo caracterizada pela redução da massa muscular, depleção dos estoques de gordura corpórea e inflamação crônica generalizada. Estudos demonstram que alterações na composição da microbiota intestinal parecem estar particularmente relacionadas ao desenvolvimento de síndromes e doenças metabólicas, como obesidade e diabetes e, portanto, o desequilíbrio da microbiota (situações conhecidas como disbioses) poderiam não apenas contribuir para o agravamento de infecções por patógenos, mas também para o estabelecimento de quadros inflamatórios crônicos, uma vez que a alteração na microbiota interage diretamente com o sistema imune do hospedeiro (ALMEIDA *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2008; FEARON *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015). Diversos trabalhos foram e estão sendo conduzidos de maneira a identificar modificações na microbiota intestinal associadas a diversas patologias, utilizando regiões do gene que codificam o RNA ribossomal 16S rRNA, que apresenta 9 regiões hipervariáveis alternadas com regiões altamente conservadas (FORDE *et al.*, 2013). Então, as regiões conservadas são utilizadas para desenhar *primers* capazes de amplificar as regiões hipervariáveis de bactérias presentes em uma população mista. De maneira análoga, a análise do micobioma também se concentra em sequenciar a região que codifica o rRNA eucariótico, conhecida como cistron ribossomal, que também apresentam regiões conservadas e variáveis. Estudos recentes vêm utilizando a técnica de sequenciamento de regiões intergênicas conhecidas como ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossomal (ARGILÉS *et al.*, 2005 TANAKA *et al.*, 2009; NILSSON, 2009). Então, uma vez que a caquexia trata-se de uma síndrome diretamente associada a disfunções no metabolismo energético, não chega a ser surpresa verificar que alterações na composição da microbiota também estejam correlacionadas com o desenvolvimento de quadros caquéticos, assim como foi verificado nos casos de obesidade e diabetes (BINDELS *et al.*, 2015, 2016). No entanto, os autores que se dedicaram a este estudo se concentraram no estudo do micobioma associado a caquexia induzida por células C26 e Baf. Portanto, o projeto aqui apresentado tem por objetivo padronizar protocolos que serão utilizados, pela primeira vez, para caracterizar de maneira abrangente (bactérias e fungos) as alterações que ocorrem na microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 durante o desenvolvimento de caquexia induzida por transplante tumoral subcutâneo, com células tumorais da linhagem LLC (câncer pulmonar).

OBJETIVOS

Induzir caquexia nos camundongos C57BL/6 por transplante tumoral subcutâneo de células da linhagem LLC (Lewis Lung Carcinoma); avaliar o estabelecimento da caquexia nesses animais; padronizar protocolos de extração de DNA total do material fecal camundongos; testar pares de *primers* capazes de amplificar as regiões hipervariáveis presentes nos genes ribossomais 16S e ITS, através de PCR convencional.

METODOLOGIA

A indução de caquexia foi realizada a partir da inoculação de $3,5 \times 10^5$ células tumorais da linhagem LLC no flanco direito de 40 camundongos C57BL/6. A massa corporal foi aferida diariamente ao longo dos 28 dias do período experimental. As fezes dos camundongos foram coletadas, de maneira estéril, antes da inoculação das células LLC (dia 0) e no dia 28, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C . Após o sacrifício dos animais, foram retirados, dissecados e pesados os depósitos de tecido adiposo e de tecido tumoral. Dois testes foram realizados para padronizar a extração do DNA genômico das amostras fecais, a saber, o protocolo descrito por Zoetendal e colaboradores (2006) com modificações baseadas em Delgado e colaboradores (2013), e a partir do kit DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN). Em seguida, realizou-se seleção dos *primers* a serem utilizados para caracterização de bactérias e fungos a partir de um extenso levantamento bibliográfico. Logo após, reações de PCR (amplificação em cadeia da polimerase) foram realizadas utilizando DNA genômico fecal extraído com o kit Power Soil. Cada reação foi realizada a partir 12,5 ng de DNA genômico (ou 100 ng para os experimentos visando amplificar a região intergênica fúngica), seguindo as recomendações da Illumina para as condições de ciclagem e montagem da reação de amplificação. Após a amplificação, o resultado foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira a estabelecer o grau de caquexia nos animais do nosso grupo experimental, utilizamos as recomendações do Consenso Brasileiro de Caquexia (2012). Os camundongos que apresentaram no 28º dia perda de massa em relação ao dia do aparecimento do tumor foram classificados em pré-caquéticos (perda de massa entre 1 e 5%), caquéticos (perda de 5% a 10%) e com caquexia refratária (perda maior que 10%). Alguns animais apresentaram ganho de massa corporal e foram classificados como grupo controle, uma vez que a caquexia não foi estabelecida. Além desse padrão clássico de perda de massa corpórea, avaliamos os animais através do parâmetro descrito por Deminice (2016), conhecido como *Índice de caquexia*. Os dados obtidos através do índice coincidem em aproximadamente 70% com os dados verificados pela metodologia da redução de massa. Paralelamente, nos concentramos em testar dois métodos de extração de DNA. O kit DNeasy PowerSoil da QIAGEN® foi eficaz e permitiu a obtenção de material suficiente para a realização dos testes posteriores. Assim, realizou-se a extração de DNA total das 80 amostras fecais, que foram quantificadas em fluorímetro, obtendo-se um rendimento médio de 2 µg.

Posteriormente, foi realizada a seleção de *primers* a serem testados para padronização do mesmo. O conjunto de *primers* que parecia mais apropriado para o nosso estudo foram 3 iniciadores para 16S rRNA, sendo eles: V3/V4 341F-806R (ILLUMINA *et al*, 2012); V4/V5 515F- 806R (BINDELS *et al*, 2016) e V5/V6 784F-1064R (WALTERS *et al*, 2016), e 12 iniciadores para ITS, sendo para ITS 1: ITS1F-ITS2 (TANG *et al*, 2015); ITS18S-ITS5.8S (STRATI *et al*, 2016); H1SeqF - H1seqRb (MAR *et al*, 2015) ; ITS5- ITS2 (BLAALID *et al*, 2013); ITS1-F_KY02-ITS2-R_KY02 (TOJU *et al*, 2012); e para ITS 2: ITS3 - ITS4 (NASH

et al, 2017); ITS3F - ITS4R (KIM *et al*, 2017); FSeq – Rseq (HEISEL *et al*, 2015); H2SeqF - H2seqRb (MAR *et al*, 2015); ITS2F – ITSr (SOKOL *et al*, 2016); F ITS7- ITS4 (FUJIMURA *et al*, 2015); ITS3_KY02- ITS4 (TOJU *et al*, 2012). Esses iniciadores foram sintetizados e as ampliações realizadas de acordo com o recomendado pela Illumina. Durante os testes, variações na temperatura de anelamento e na quantidade de ciclos foram realizadas. Para a amplificação do fragmento 16S rRNA, optamos pelo par de *primers* 515F- 806R, que amplifica a região V4-V5. Esse par permite, além da identificação de espécies pertencentes ao Reino Bacteria, também ampliar a análise identificando representantes do Reino Archaea, ou seja, será possível caracterizar ambos os reinos por meio do sequenciamento da mesma região 16S rRNA (OWEN *et al.*, 2015; WALTERS *et al*, 2016; FADROSH *et al.*, 2016). Para amplificar a região ITS, os melhores resultados foram obtidos para os pares de *primers* ITS2F – ITSr (SOKOL *et al*, 2016), ITS18S - ITS5.8S (STRATI *et al*, 2016) e H1SeqF - H1SeqRb, H2SeqF - H2SeqRb (MAR *et al*, 2015). Estudos demonstraram que a região ITS1 se comparada a região ITS2, parece ser mais adequada para análise comparativa entre taxons. Isso se dá devido a maior variabilidade no ITS1, o que permite uma maior distinção entre espécies (MANZONNI *et al*, 2010; MENEZES *et al*, 2010; PRETOZZO *et al*, 2014) e, por esse motivo os *primers* que amplificam a região ITS2 foram excluídos da padronização. Entre os dois iniciadores restantes, optou-se por escolher o *primer* ITS18S - ITS5.8S (STRATI *et al*, 2016) porque além de apresentar bons resultados nos testes realizado, esse mesmo iniciador foi utilizado por nosso grupo de pesquisa em análises de bioinformática em trabalhos em colaboração. Como resultado, pode-se dizer que esse par de *primers* fornece um *amplicon* que facilita o emprego da *pipeline* necessária para analisar esse conjunto de dados em larga escala.

CONCLUSÕES

A indução da caquexia em camundongos C57BL/6 por inoculação de células tumorais da linhagem LLC foi realizada com êxito. Avaliou-se o estabelecimento da caquexia nos camundongos usando dois métodos de indução descritos na literatura. Nossos dados apresentaram concordância entre as metodologias testadas. Dados com relação a massa de tecido adiposo dos camundongos também foram avaliados e, desta forma, os animais foram classificados em diferentes grupos quanto a progressão da caquexia, levando em consideração esses três aspectos citados. O material genético coletado foi extraído utilizando o kit DNeasy PowerSoil, que possibilitou maior rendimento (em torno de 2 µg), quando comparado com o método de extração sem o uso de kit (em torno de 12 ng). Portanto, com essa abordagem de extração, temos quantidade suficiente de material para futuramente realizar a preparação das bibliotecas de 16S rRNA e ITS. Dessa forma, todas as 80 amostras já foram extraídas e estão aptas a serem amplificadas. Em seguida, foi possível definir os *primers* que serão utilizados para a amplificação e posterior sequenciamento da região ITS (fungos) e 16S rRNA (bactérias). Optou-se pelo iniciador 515F- 806R, que amplifica a região V4-V5 do gene ribossomal 16S de bactérias, uma vez que, além de ser capaz de identificar o Reino Bacteria, caracteriza também o Reino Archaea. Já para a amplificação da região ITS, escolheu-se o par ITS18S - ITS5.8S que amplifica a região ITS1, uma vez que, da mesma forma que o par 515F- 806R, apresentou excelentes resultados nos testes de amplificação, com padrão de banda com apenas um *amplicon* bem definido e de tamanho esperado e alto rendimento do material. Assim, o objetivo do projeto foi concluído, sendo a próxima etapa, utilizar os *primers* padronizados para amplificar e sequenciar as regiões variáveis dos genes ribossomais de bactérias e fungos, o que irá permitir a caracterização e mapeamento, por NGS, das diferenças que ocorrem na diversidade e composição da microbiota e do microbioma intestinal de camundongos C57BL/6 antes (dia 0) e após a indução da caquexia (dia 28),

induzida por implante de células da linhagem tumoral LLC (câncer pulmonar) a partir das amostras extraídas nesse projeto.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. *et al.* Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal. **R. Bras. Zootec.** v.35, n.6, p.2359-2367, 2003.

ARGILÉS, J. M. Cancer-associated malnutrition. **European Journal Oncology Nursing.** v.9: p.539-550, 2005.

BINDELS, L.B., *et al.* Non-digestible oligosaccharides modulate the gut microbiota to control the development of leukemia and associated cachexia in mice. **Plos One**, v.10, n.6, p.e0131009, 2015.

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

BLAALID, R., *et al.* Changes in the root-associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. **Molecular Ecology.** V.21, p.908-1897, 2013.

DELGADO, S., *et al.* Microbiological Survey of the Human Gastric Ecosystem Using Culturing and Pyrosequencing Methods. **Microb Ecol**, v. 65, p.763–772, 2013.

DEMİNICE, R., *et al.* Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia progression in Walker-256 tumor-bearing rats. **Amino Acids.** V. 48, p. 64-126, 2016.

EVANS, W.J., *et al.* Cachexia: a new definition. **Clin Nutr.**, v.27, n.6, p.793-799, 2008.

FEARON, K, *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet Oncol.**, v.12, n.5, p.489-495, 2011.

FADROSH, M., *et al.* Probiotics and microbiota composition. **BMC Med.** V.14, p-60-82, 2016.

FORDE, B.M. TOOLE. Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. **Brief Funct Genomics.** V.12, p. 353-440, 2013.

FUJIMURA, H., *et al.* House dust exposure mediates gut microbiome Lactobacillus enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. **Proc Natl Acad Sci.** V. 111, p. 805–810, 2015.

HEISEL, T., Complementary Amplicon-Based Genomic Approaches for the Study of Fungal Communities in Humans. **PLoS One.** V-10, p- 28-40, 2015.

ILLUMINA, 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Supporting Information. 02-28, 2012.

KIM, D., *et al.* Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. **The Journal of Nutritional Biochemistry.** Volume 44, P. 35-43, 2017.

MAR, R., *et al.* Obesity changes the human gut mycobiome. **Scientific Reports.** V. 65, p.153-163, 2015.

NASH AK, *et al.* The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. **Microbiome**. V. 02; pag. 5:153, 2017.

NILSSON, R.H., *et al.* The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing Technologies. **FEMS Microbiology Letters**. V. 296, P. 97–101, 2009.

OWEN. S.A., *et al.* The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**. V-12, p. 34-51, 2015.

SOKOL, H., *et al.* Fungal microbiota dysbiosis in IBD. **BMJ Journals**. V-163, p. 87-101, 2016.

STRATI, F, *et al.* Age and Gender Affect the Composition of Fungal Population of the Human Gastrointestinal Tract. **Frontiers in Microbiology**. V. 07; p. 12-27, 2017.

TANAKA, K., *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **PNAS**. V.109, p. 6241-6246, 2009.

TANG, J., *et al.* Mycobiome: Approaches to Analysis of Intestinal Fungi. **Journal of immunological methods**. V.04, pag.112-121, 2015.

TOJU, H., *et al.* High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. **Plos One**. p.65, 2012.

WALTERS, W., *et al.* Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. **Msystems**. V. 10, p. 34-58, 2016.

ZHANG, Y., *et al.* Metagenomics: A New Way to Illustrate the Crosstalk between Infectious Diseases and Host Microbiome. **Int J Mol Sci**, v.16, n.11, p.2; 2015.