

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ISOLAMENTO DE PARTÍCULAS VIRAIS PRESENTES NO INTESTINO DE CAMUNDONGOS C57BI/6

Lucas de Moura Carvalho¹; Regina Costa de Oliveira²; Luiz Roberto Nunes³, Daniela Leite Jabes⁴

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: lucas.mc03@gmail.com
2. Coordenadora do Programa de Biotecnologia; e-mail: reginaco@umc.br
3. Professor e pesquisador; e-mail: nunes1212@gmail.com
4. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br

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

Palavras-Chaves: Viroma; Caquexia; Microbioma.

INTRODUÇÃO

O microbioma intestinal é composto por microrganismos eucariotos, bactérias, arqueobactérias e vírus, muitas vezes responsáveis por regular mecanismos fisiológicos em seu hospedeiro, caracterizando a presença dessa microbiota natural como uma associação harmônica (CANI *et al.*, 2012). Atualmente, têm se dado destaque para relação entre o microbioma e seu respectivo hospedeiro, especialmente em situações desarmônicas, conhecidas como disbioses (ZHANG *et al.*, 2015). No entanto, a maioria dos estudos visando a caracterização da microbiota se concentra em detectar somente as bactérias devido a facilidade em amplificar e sequenciar o gene que codifica para o 16S rRNA, aliada à sua alta capacidade discriminatória entre bactérias e à existência bancos de dados bem estabelecidos para a comparação de sequências. Em contraste, estudos visando a identificação do viroma são escassos, uma vez que, ao contrário de bactérias e fungos, não possuem rRNA ou regiões genômicas universalmente conservadas, sendo necessário o sequenciamento de seus respectivos genomas para que seja possível sua identificação e posterior caracterização (VIRGIN, 2014). Portanto, diante do exposto, uma vez que a identificação do viroma não pode ser realizada a partir de regiões conservadas que permitam o sequenciamento de *amplicons*, além do fato de que a maioria do material genético obtido de amostras de microbiota costuma ser de origem não-viral, o estudo do viroma se torna ainda mais desafiador. Os passos-chave para o estudo de viromas devem incluir o enriquecimento de partículas virais (VLPs) de uma amostra, aliado a amplificação randômica do material genético nelas contido, de maneira a evitar perdas de qualquer tipo de vírus e minimizar o viés introduzido durante as etapas de preparação, que incluem sucessivas centrifugações e filtrações. Apesar destes desafios, o estudo do viroma também vem se mostrando bastante promissor no que se refere ao seu envolvimento nos processos de promoção de saúde e disbiose (YADAV *et al.*, 2016). Dentre as técnicas utilizadas para obtenção de partículas virais para identificação de viromas, destaca-se a metodologia *Novel enrichment technique of VIRomes (NetoVir)*. Portanto, esse trabalho visa validar o protocolo *NetoVir* para extração de partículas virais presentes em amostras fecais de camundongos C57BL/6, além de testar a abordagem de transcrição reversa e amplificação proposta por Li *et al.* (2015). Dessa forma, uma vez que nosso grupo de pesquisa vem se dedicando a realizar, pela primeira vez, uma caracterização abrangente (incluindo bactérias, fungos e vírus) das alterações que ocorrem na microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 durante o desenvolvimento de caquexia, esse trabalho teve como objetivo iniciar alguns experimentos de padronização de técnicas com vistas a identificação, em um futuro próximo, das alterações presentes no viroma de camundongos com caquexia induzida por células LLC (câncer pulmonar).

OBJETIVO

Padronizar protocolos para a extração de DNA e RNA de partículas virais presentes no material fecal de camundongos C57BL/6.

METODOLOGIA

Como recomendado pelo protocolo NetoVIR (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2015), amostras fecais coletadas de camundongos C57BL/6 (CEUA n°012/2017) foram ressuspensas em solução PBS 1% e homogeneizadas a 3000 rpm por 1 min. A solução resultante foi centrifugada a 17.000 g por 3 min. Em seguida filtrações foram realizadas por membranas de PVD 1,0 e 0,22 µm sob centrifugação a 17.000 g, por 1 min. Coletou-se 150 µL da solução, que foram tratadas com 2 µL de Benzonase (200 U/µL) e 1 µL (250 U/µL) nuclease micrococcica. A extração de DNA e RNA de VLPs foi realizada com auxílio do kit *QIAmp® Viral RNA Mini*, sem carreador de RNA, conforme descrito protocolo *NetoVir*. O material extraído foi quantificado em fluorímetro Quantus utilizando os kits *QuantiFluor ONE dsDNA System* e *QuantiFluor RNA System*. O produto resultante da extração foi submetido à síntese de cDNA e duas abordagens distintas foram testadas, uma proposta por Conceição-Neto *et al.* (2015) com uso do kit WTA2 e outra sugerida por Li *et al.* (2015), sem kit, por síntese com *primer* randômico (GCCGACTAATGCGTAGTCNNNNNNNNNN) usando *SuperScript III* no 1º round de transcrição reversa e *Klenow fragment* no 2º round, seguido nova amplificação randômica (*primer* GCCGACTAATGCGTAGTC). O produto final foi purificado com *kit QIAquick PCR Purification*.

Para fins de avaliação do material obtido, realizou-se PCR com os *primers* 515F/806R que amplificam as regiões hipervariáveis V4-V5 do gene 16S rRNA de bactérias e *primers* ITS 18S/ITS 5.8S que amplificam a região espaçadora ribossomal 1 (ITS1) de fungos. Amostras foram amplificadas a 94°C por 30 segundos, 35 ciclos (94°C por 45s, 50°C por 60s, 72°C por 90s), 72°C por 10 minutos (5 µM de *primers*, 12,5 µL de mix Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, volume final 25 µL) e quantificadas em fluorímetro Quantus com *kit QuantiFluor ONE DNA System*. O material extraído também foi submetido a PCR a 95°C por 5 min, 35 ciclos (95°C por 45 s, 50°C por 45 s, 72°C por 45 s), 72°C por 10 minutos com *primers* responsáveis por amplificar regiões referentes aos grupos virais *Podoviridae*, *Myoviridae*, *Adenoviridae*, *Parvoviridae* e *Circoviridae*, e genes GAPDH e IL-10 de camundongos. As condições da reação foram iguais para todas as amostras, exceto a temperatura de anelamento, que foi alterada de acordo com o respectivo grupo viral (1 µM de *primers*, 10 µM dNTPs, 50 µM MgCl₂, 10 X PCR Buffer e 40U/µL de *TaqPlatinum*, volume final 25 µL). O produto da PCR foi quantificado em fluorímetro Quantus com *kit QuantiFluor ONE DNA System* e avaliado por eletroforese. Uma vez que foi identificada a presença de DNA bacteriano e fúngico nas amostras, optou-se por realizar algumas modificações no protocolo *NetoVir*, a saber: (i) dobrar a quantidade de enzima recomendada: 4 µL Benzonase e 2 µL Micrococcal nuclease e (ii) manter as quantidades de enzimas recomendadas, porém dobrar o tempo de incubação enzimática, que passou a ser realizado por 4 horas. Em seguida, a amostra submetida ao protocolo sem alterações, além das duas que passaram por modificações com relação ao tratamento enzimático, foram submetidas a preparação de bibliotecas para sequenciamento NGS com *kit Illumina Nextera XT*. Amostras foram fragmentadas (tagmentação a 55°C por 4 minutos) e amplificadas a 72°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos, 15 ciclos (95°C por 10s, 55°C por 30s, 72°C por 45s), 72°C por 2 minutos. As bibliotecas foram purificadas com *AMPure beads*, seguindo instruções do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi avaliada em eletroforese capilar em aparelho *Bioanalyzer 2100*, usando chip *High sensitivity DNA*, segundo recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas com *Kit Kapa Library Quantification* em equipamento *ABI Prism 7500 fast*. O sequenciamento *paired-end* (2x75 ciclos) ocorreu em equipamento *MiSeq* com *pool* de amostras a 2 nM a partir de 5 µL de cada biblioteca produzida, usando *kit MiSeq Reagent v3*.

RESULTADOS /DISCUSSÃO

A composição da microbiota humana é considerada uma importante fonte de variação interindividual na imunidade e, por extensão, na suscetibilidade às doenças. Bactérias presentes no intestino têm sido o principal foco de pesquisa atualmente nessa área. No entanto, diversas comunidades de vírus que infectam bactérias e o hospedeiro animal coabitam o trato gastrointestinal e constituem coletivamente o que chamamos de viroma intestinal. Embora os vírus sejam tipicamente estudados como patógenos, trabalhos recentes vêm destacando a relação entre os vírus e o hospedeiro como mais semelhante às interações hospedeiro-microbioma, o que inclui relações tanto benéficas como prejudiciais para o hospedeiro. Esses vírus são provavelmente fontes de variação imunológica, tanto local quanto extraintestinal. Portanto, é notória a capacidade dos vírus em modular as respostas do hospedeiro durante a homeostase e a doença (BARR, 20130). No entanto, a identificação do viroma é um desafio se comparadas as análises que envolvem a identificação de bactérias e fungos. Além das dificuldades inerentes a extração de partículas virais, há necessidade de realizar a transcrição reversa, uma vez que há RNA como material genético de alguns tipos virais. Além disso, a amplificação deve ser randômica, frente a carência de regiões conservadas como o 16S bacteriano e o ITS fúngico. Adicionalmente, os dados gerados precisarão ser alinhados na tentativa de se montar genomas individuais para cada tipo viral identificado (ILLUMINA, 2013; ILLUMINA 2019; BOLYEN *et al.*, 2019). Nesse contexto, Reyes *et al.* (2012) ressalta as dificuldades inerente aos métodos de obtenção de material genético de origem viral, pois para enriquecer VLPs é necessário um esforço adicional que se caracteriza por depletar uma série de contaminantes como organelas, DNA e RNA não alvo provenientes de bactérias e fungos, devido ao fato de que a população de material viral é consideravelmente ínfima quando comparada aos anteriores. Além disso, Carding *et al.* (2017) afirma que existem outros desafios a serem contornados no estudo do viroma, entre eles estão a profundidade do sequenciamento e os métodos de análise de dados. Atualmente, as técnicas disponíveis para o isolamento de VLPs permitem enriquecer material viral dos mais diversos nichos anatômicos como por exemplo pele (HANNIGAN *et al.*, 2015), vias respiratórias (GOYA *et al.*, 2018), boca (WYLIE *et al.*, 2014) e fezes (DENG *et al.*, 2019). No caso de amostras fecais, o protocolo de preferência tem sido o *Novel enrichment technique of VIRomes (NetoVir)*. Em comparação a outros métodos de isolamento viral, o *NetoVIR* evita o uso de centrifugação em gradiente de Cloreto de Césio (CsCl) (KLEINER *et al.*, 2015) e membranas com porosidade menor que 0,2 µm bem como homogeneização utilizando beads de cerâmica, que podem limitar o rendimento de material viral resultante (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2015). Um outro fator interessante com relação ao protocolo proposto por Conceição-Neto *et al.* (2015) é o fato dele otimizar a quantidade de reações do kit WTA 2 (Sigma®), diminuindo em 5 vezes o volume de reagentes para realizar a transcrição reversa e amplificação de cDNA, quando comparado ao protocolo do fabricante. Dessa maneira, é possível realizar 50 reações ao invés de 10, o que garante um menor custo no isolamento de material viral (BAL *et al.*, 2018). Frente a esses desafios, o trabalho aqui apresentado visou padronizar condições para o de isolamento de DNA viral presentes em intestino de camundongos C57BL/6 a partir de amostras fecais. Durante a comparação dos métodos de enriquecimento de partículas virais, utilizando as metodologias propostas por Li *et al.* (2015) e Conceição-Neto *et al.* (2015), obtivemos maior rendimento, cerca de 23 vezes, utilizando o protocolo NetoVIR.

Após a primeira etapa de extração de material genético de VLPs, obteve-se o rendimento de 414 e 444 ng de RNA. Com a transcrição reversa, amplificação e purificação do material genético viral, o rendimento foi de 24,35 ng de cDNA, com o protocolo de Li *et al.*, (2015) e 1,15 µg de cDNA aplicando o método *NetoVir*. Após novas amplificações, visando otimizar o rendimento obtido pelo método proposto por Li *et al.*, (2015), alteramos a ciclagem de 17 para 30. Como resultado, houve rendimento de 49,25 ng e 42,05 ng para as amostras testadas, respectivamente. Optou-se por seguir apenas com amostras produzidas com

NetoVir, uma vez que apresentou o melhor rendimento. Contudo, realizada a PCR para avaliação do material obtido, não foi possível concluir se há material viral, visto que não obtivemos os *amplicons* esperados. Verificou-se que parece não haver amplificação das regiões referentes ao GAPDH e IL-10 murino. No entanto, o material ainda contém DNA fúngico e bacteriano. Diante desses resultados, foi necessário reavaliar o protocolo *NetoVir*, a fim de alcançar a diminuição de contaminantes. Foram então realizadas modificações nos tratamentos com nucleases, resultando em 2,1 µg e 1,8 µg de cDNA final. Verificou-se, após nova PCR, diminuição de material genético contaminante. Então, três amostras foram submetidas a preparação de bibliotecas para sequenciamento NGS: 1. Amostra submetida ao protocolo sem alterações; 2. Amostra tratada com o dobro da quantidade de enzima recomendada pelo *NetoVir*; 3. Amostra com as quantidades de enzimas recomendadas, porém incubadas com o dobro do tempo de descrito pelo *NetoVir*. Após protocolo de preparação das bibliotecas, foi realizada eletroforese digital em *Bioanalyzer* (Agilent). Como resultado, verificou-se que o tamanho dos fragmentos gerados estava entre 340 e 360 pb, de acordo com o recomendado pela *Illumina*. Após quantificação absoluta, as três bibliotecas foram sequenciadas em aparelho *MiSeq-Illumina*. Como resultado, em relação à quantidade total de sequências produzidas no sequenciamento, mais de 65%, ou seja, cerca de 4,3 milhões de *reads* foram identificados. A Biblioteca 1 apresentou cerca de 1,3 milhão de *reads*; a Biblioteca 2 cerca de 1,4 milhão de *reads* e a Biblioteca 3 cerca de 1,5 milhão de *reads*. Portanto, a distribuição das quantidades de *reads* foi similar entre as bibliotecas. Além disso, todas as bibliotecas apresentam qualidade adequada, visto que mais de 76% possui *score Q* ≥ 30. As análises de Bioinformática ainda estão sendo realizadas. No entanto, análises preliminares apontam para maior obtenção de material viral para a Amostra 3. Nossos resultados mostram que, após os testes aplicados, a presença de material oriundo de bactérias e fungos parece ter diminuído nas amostras com alteração das condições de tratamento enzimáticos propostos no *NetoVir*, especialmente quando se aumenta o período de incubação.

CONCLUSÕES

Foi possível realizar o enriquecimento das partículas virais utilizando o método *NetoVir*. O material genético obtido a partir desse protocolo, proposto por Conceição-Neto *et al.* (2015) possibilitou maior rendimento (~2 µg), quando comparado ao método proposto por Li *et al.* (2015), ~ 24 ng. No entanto, modificações foram incorporadas ao protocolo original *NetoVir* de maneira a minimizar a contaminação com DNA bacteriano e fúngico. Tais modificações, que incluíram adaptações no protocolo de tratamento enzimático, parecem ter minimizado a contaminação. No entanto, testes adicionais ainda precisam ser realizados de maneira a obtenção de material genético viral em quantidade suficiente para que as análises do viroma de camundongos submetidos a caquexia induzida por células LLC possam ser conduzidos.

REFERÊNCIAS

- BAL, A. *et al.* Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow. **BMC Infect Dis.** 2018;18(1):537. 2018.
- BARR, J. J. *et al.* Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 26, p. 10771-10776, 2013.
- BOLYEN, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, p. 1, 2019.

CANI, P., *et al.* Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. **Gut Microbes**. V.1, p.279–288, 2012.

CONCEIÇÃO-NETO, N. *et al.* Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. **Scientific Reports**, 5;16532. 2015.

DENG, Ling *et al.* A Protocol for Extraction of Infective Viromes Suitable for Metagenomics Sequencing from Low Volume Fecal Samples. **Viruses**, v. 11, n. 7, p. 667, 2019.

GOYA, Stephanie *et al.* An optimized methodology for whole genome sequencing of RNA respiratory viruses from nasopharyngeal aspirates. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0199714, 2018

HANNIGAN, Geoffrey D. *et al.* The human skin double-stranded DNA virome: topographical and temporal diversity, genetic enrichment, and dynamic associations with the host microbiome. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01578-15, 2015.

ILLUMINA. **16S metagenomic sequencing library preparation**. 2013.

ILLUMINA. **Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol**. 2019.

KLEINER, M *et al.* Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 7, 2015.

LI L, *et al.* Comparing viral metagenomics methods using a highly multiplexed human viral pathogens reagent. **J Virol Methods**.;213:139–46. 2015.

REYES, A. *et al.* Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 607, 2012.

VIRGIN, H. W. The virome in mammalian physiology and disease. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 142-150, 2014.

WYLIE, Kristine M. *et al.* Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults. **BMC biology**, v. 12, n. 1, p. 71, 2014.

YADAV, H., *et al.* Increased fecal viral content associated with obesity in mice. **World J Diabetes**, v.15, p.316-320, 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.

AGRADECIMENTOS

A UMC e FAPESP pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto, aos amigos, colegas e professores pelo incentivo e pelo aprendizado.