

## **ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE CAQUEXIA INDUZIDA POR TRANSPLANTE DE CÉLULAS DE CÂNCER PULMONAR (LLC)**

Yara Natercia Lima Faustino de Maria<sup>1</sup>; Regina Costa de Oliveira<sup>2</sup>, Luiz R. Nunes<sup>3</sup>; Daniela Leite Jabes<sup>4</sup>

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

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

**Palavras-Chaves:** Caquexia; NGS; Microbioma.

### **INTRODUÇÃO**

A caquexia é uma síndrome metabólica associada a diversas doenças, como câncer, doença renal crônica, doenças cardíacas crônicas, entre outras enfermidades. Atualmente, a caquexia é caracterizada como uma síndrome metabólica multifatorial, no qual inflamação, resistência à insulina e aumento na degradação de proteínas musculares estão frequentemente associadas ao quadro da doença (TISDALE, 2008; BRUERA, 2012). Além disso, estudos demonstraram que alterações na composição da microbiota intestinal estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de síndromes e doenças metabólicas, dando muito destaque ao estudo do microbioma associado a síndromes e doenças metabólicas, tais como diabetes, obesidade e dislipidemia, uma vez que é possível estabelecer uma “assinatura microbiana” para os pacientes com as patologias metabólicas citadas, demonstrando que alterações na composição da microbiota intestinal parecem estar particularmente relacionadas ao desenvolvimento dessas patologias (KONNER *et al.*, 2011; ZUPANCIC *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2014). Portanto, desequilíbrios na microbiota intestinal (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. Então, uma vez que a caquexia se trata 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 em outras patologias. Portanto esse projeto visa caracterizar e mapear a microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 durante o desenvolvimento de caquexia induzida por transplante tumoral subcutâneo, com células tumorais da linhagem LLC (câncer pulmonar) por NGS.

### **OBJETIVOS**

Realizar, pela primeira vez, uma caracterização das alterações que ocorrem na microbiota intestinal de camundongos C57Bl/6 durante o desenvolvimento de caquexia induzida por células tumorais da linhagem LLC (câncer pulmonar).

### **METODOLOGIA**

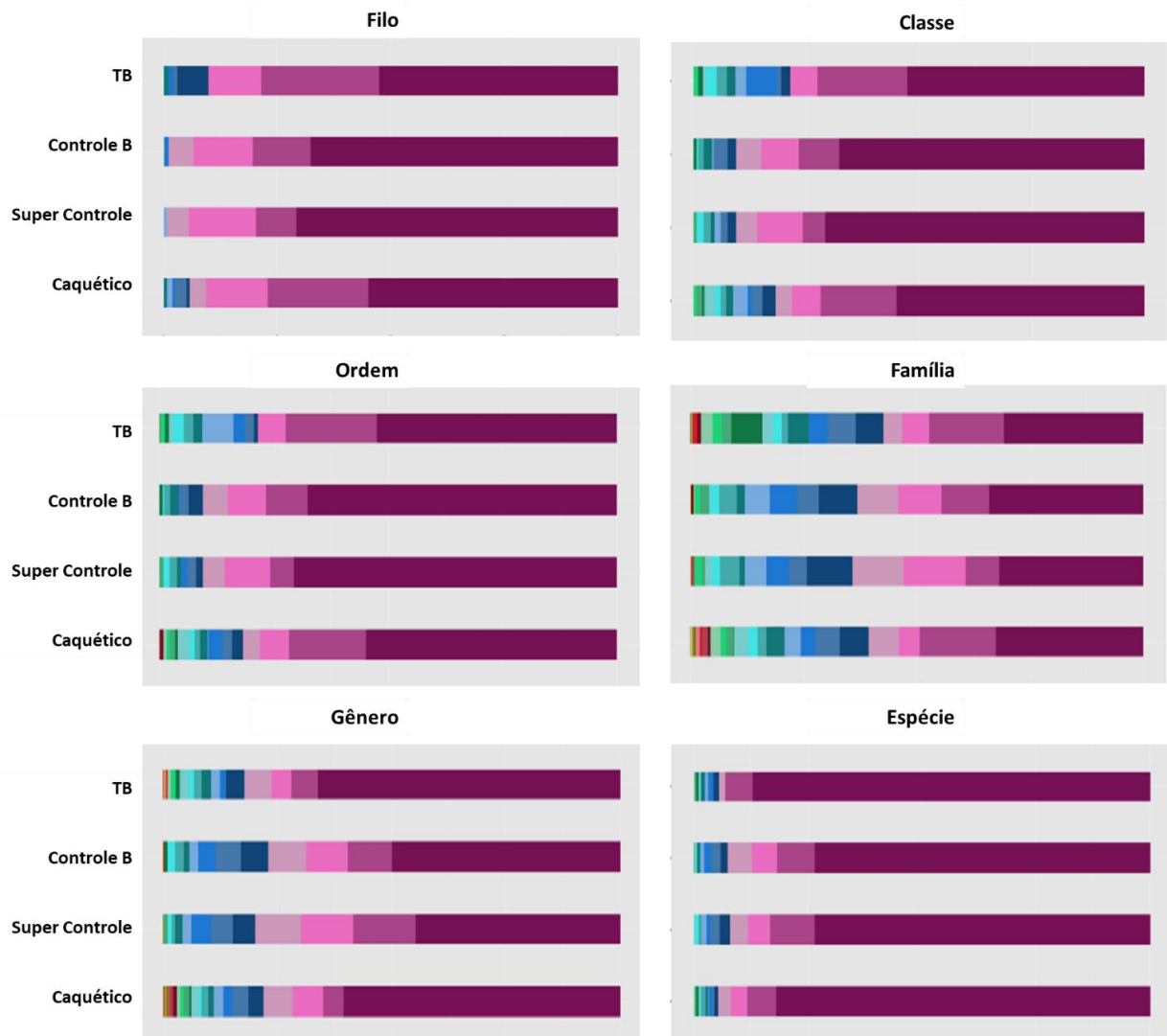
Foram sintetizados *primers* específicos para amplificar a região V4-V5 do gene 16S ribossomal bacteriano (WALTER *et al.*, 2017) com adição de uma sequência chamada de

*overhang*, recomendada pela *Illumina*. As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas de acordo com o indicado no documento *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina)*. Após o primeiro *round* de amplificação, as amostras foram purificadas utilizando *beads* magnéticas (*Ampure XP beads*), seguindo com nova amplificação, dessa vez para anexar os *indexes* Nextera® XT (*Illumina*), seqüências compatíveis com o *overhang* e necessárias para as etapas de sequenciamento no MiSeq. Em seguida, realizou-se o segundo *round* de purificação com as *beads* magnéticas. A qualidade das amplificações, bem como das bibliotecas finais, foi avaliada em aparelho *Bioanalyzer 2100 (Agilent)*, Chip DNA 1000. As 60 amostras (representativas da indução de caquexia em 30 camundongos no tempo 0 e 28 dias) foram sequenciadas com o *kit MiSeq Reagent V3 (Illumina)* em sequenciador MiSeq (*Illumina*). Deste modo, com o sequenciamento finalizado, foram realizadas análises de bioinformática, que consistiram em três etapas: pré-processamento, processamento e pós processamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental de 28 dias, a massa dos animais foi aferida diariamente e as amostras fecais foram coletadas antes (dia 0) e depois (dia 28) do desenvolvimento do quadro caquético. Além disso, os animais que apresentaram perda de massa de 5% a 10% foram classificados como caquéticos (CQ, n=9), enquanto os animais que apresentaram ganho de massa foram classificados como portadores de tumor (TBs, n=10). Além desses, 11 animais não foram inoculados com células LLC. Ao todo, 60 amostras foram amplificadas (região V4-V5 do gene 16S RNA) e a qualidade das amplificações e o tamanho dos fragmentos gerados foram avaliados a partir dos dados obtidos pelo *Bioanalyzer 2100 (Agilent)*. Após as etapas de bioinformática, foi gerada uma OTU *table* que contém todas as OTUs (unidades taxonômicas operacionais) identificadas após as análises de todas as amostras. A OTU *table* foi, então, submetida ao *Microbiome Analyst* (DHARIWAL *et al.*, 2017) para realizar testes estatísticos. Desta forma, ao aplicarmos nossos dados nesta ferramenta, verificou-se uma notória mudança da composição bacteriana entre os grupos estudados. Os animais pertencentes aos grupos supercontrole (0 h) e controle (28 dias sem inoculação de células tumorais), como esperado, apresentaram discreta diferença na microbiota, uma vez que somente o fator tempo os diferencia. No entanto, entre os grupos TB e caquético, há diferenças acentuadas no perfil da microbiota. Portanto, observa-se a presença de disbiose tanto no grupo caquético, quanto no grupo portador de tumor, entretanto são disbioses com perfis microbianos notadamente diferentes. Além disso, independente do grupo taxonômico analisado, o padrão de disbiose é contínuo (Figura 1).

**Figura 1:** Perfil de abundância microbiana relativa nos níveis de filo a espécie nos grupos Supercontrole (0 h), Controle (28 dias sem inoculação de células tumorais), TB (com ganho de peso após inoculação de células tumorais) e caquéticos (perda de peso após a inoculação de células tumorais). É possível observar discretas diferenças no perfil da microbiota entre os grupos supercontrole e controle. No entanto, entre os grupos TB e caquético, há diferenças acentuadas no perfil da microbiota, quando comparados ao supercontrole. Em cada gráfico, a OTU é apresentada com uma cor diferente.



A fim de caracterizar as diferenças microbianas, realizou-se a análise de *LDA Effective Size (LEfSe)*, que consiste em comparar os grupos, mostrando quais OTUs estão mais predominantes em cada um deles. Deste modo, em relação ao nível taxonômico família, foi verificado que no grupo caquético há uma predominância de Clostridiaceae, Anaeroplasmataceae e Turicibacteraceae. Além disso, nossos dados *in vivo* permitiram identificar um grupo de camundongos que, apesar da presença do tumor, ganhou peso no tempo experimental estudado (28 dias). Esses animais, classificados como TBs (portadores de tumor), apresentaram a família Mycoplasmataceae como a mais prevalente e exclusivamente identificada nesse grupo. Esses dados foram analisados levando em consideração as derivações devido ao tempo experimental (usando para isso as informações obtidas pelo Controle – 28 dias). Bindels e colaboradores (2012, 2015, 2016) também se

dedicaram a identificar uma assinatura microbiana presente em camundongos submetidos a caquexia induzida por células tumorais. Porém, os modelos utilizados nos estudos conduzidos por estes autores envolveram a indução da síndrome metabólica através de transplante de células das linhagens tumorais BaF e C26. Como resultado, identificaram diminuição de representantes do gênero *Lactobacillus* e aumento de representantes da família Enterobacteriaceae sp em um desses trabalhos. Em nossos estudos também houve aumento de Enterobacteriaceae, mas essa alteração não foi identificada apenas nos camundongos caquéticos, uma vez que também estavam presentes naqueles camundongos portadores de tumor (TB). Nesse sentido, a avaliação cuidadosa dos grupos caquéticos e portadores parece ser definitiva para se identificar grupos bacterianos que são associados a caquexia, daqueles associados a presença do tumor. Nesse sentido, nossos dados também permitiram identificar as famílias que parecem ser comuns aos grupos TB e Caquético, também já levando em consideração as derivações que ocorrem naturalmente nos camundongos devido ao tempo experimental de 28 dias. Houve aumento das famílias F16 e Dehalobacteriaceae, o que nos leva a crer que sua prevalência possa estar associada a presença do tumor.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho, fomos capazes de caracterizar e mapear, por NGS, as diferenças que ocorrem na diversidade e composição da microbiota intestinal (bacteriana) de camundongos C57BL/6 caquéticos, com destaque para a prevalência das famílias Clostridiaceae, Anaeroplasmataceae e Turicibacteraceae. Além disso, nossos dados *in vivo* permitiram identificar um grupo de camundongos que, apesar da presença do tumor, ganhou peso no tempo experimental estudado (28 dias). Esses animais, classificados como TBs (portadores de tumor), apresentaram a família Mycoplasmataceae como a mais prevalente e exclusivamente identificada nesse grupo. Houve aumento das famílias F16 e Dehalobacteriaceae tanto nos Caquéticos como nos TBs.

## REFERÊNCIAS

- BINDELS, L.B., *et al.* Restoring specific lactobacilli levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. **PLoS One**, v.7, n.6, p.e37971, 2012.
- 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.; Thissenb, J.P. Nutrition in cancer patients with cachexia: A role for the gut microbiota? **Clinical Nutrition Experimental**, v.6, p.74-82, 2016.
- BRUERA, E.; HUI, D. Conceptual models for integrating palliative care at cancer centers. **J Palliat Med**, Texas, v.15, n.11, p.1261-1269, 2012.
- DHARIWAL, A.; *et al.* MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Res**, v.45, p.180-188, 2017.
- GOMES 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, 2014.
- ILLUMINA, 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Supporting Information. p. 02-28, 2012.
- KONNER, S., *et al.* Microbiological Survey of the Human Gastric Ecosystem Using Culturing and Pyrosequencing Methods. **Microb Ecol**, v. 65, p.763–772, 2011.

TISDALE 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, 2008.

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.

ZUPANCIC P., *et al.* Analysis of the gut microbiota in the old order Amish and its relation to the metabolic syndrome. **Plos One**. V.505, P.559 – 563, 2012.