

ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS T-REGULATÓRIAS NO EFEITO PROTETOR DO BUTIRATO NA INFECÇÃO POR *CLOSTRIOIDES DIFFICILE*.

Autores: Santos, J. A. C.¹; Pral P. L.²; Fachi J. L.²; Vinollo, M. A. R.³.

¹Estudante de Graduação de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Campinas.

²Doutorandos do Programa de pós-graduação do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

³Professor do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

Introdução

A *Clostridioides difficile* é uma bactéria patogênica oportunista causadora da colite, que acomete milhares de pessoas em todo mundo. Durante sua infecção a administração de butirato – um ácido graxo de cadeia resultado do metabolismo de fibras por parte de bactérias fermentadoras da microbiota – tem um efeito preventivo contra a doença desencadeando em células epiteliais respostas protetivas. Além de influenciar na ação de várias células do sistema imune, uma delas é a célula T regulatória. As células T regulatórias possuem um papel fundamental na homeostase intestinal, e são extremamente relevantes em um contexto de inflamação intestinal. Seu perfil regulatório, pode então ter influencia no efeito protetor desenvolvido pelo butirato.

Objetivos

Este projeto tem por objetivo compreender os efeitos do butirato em células T regulatórias, e como seus efeitos nessas células podem proteger o intestino durante a infecção por *C.difficile*.

Metodologia

Utilizamos camundongos DEREK, os quais possuem uma alteração gênica que os fazem expressar um receptor de toxina diftérica em células T-regulatórias. Ao administrar de toxina diftérica as células são induzidas à apoptose o que reduz sensivelmente as populações de células T-regs.

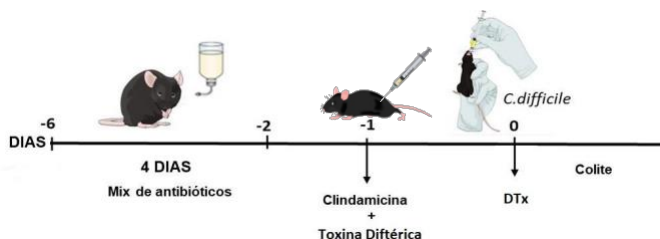


Figura 1: Modelo experimental: camundongos com 08 semanas de idade foram previamente tratados com antibióticos para indução da CDI (Chen et al., 2008) e então receberam injeção com toxina diftérica e depois foram infectados por gavagem com 1×10^8 UFC de *Clostridioides difficile*. Os animais foram monitorados diariamente pelos próximos 4 dias quanto surgimento dos sinais e sintomas clínicos da infecção e variação da perda de peso. Realizou-se a extração de células imunes do tecido intestinal e foi executada uma marcação por imunofluorescência com posterior leitura por citometria de fluxo.

Resultados e Discussões

Primeiramente foi executado e padronizado o protocolo de depleção de Tregs e em seguida foi executado o protocolo de infecção em animais com depleção dessas células e em seus controles *Wilde Type (WT)*.

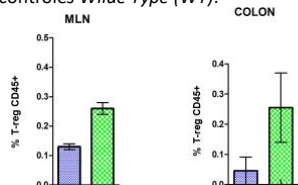


Figura 2: Redução dos números de células T regulatórias no cólon e no linfonodo mesentérico de camundongos DEREK após a administração da toxina diftérica, na concentração de 1 ug em 50 uL, duas injeções no intervalo de 24 horas entre uma e outra. Resultados apresentados como média +/- SEM de dois experimentos independentes com n= 3 WT e 4 DEREK.

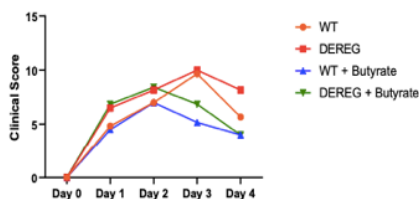


Figura 3: Gráfico de escore clínico de evolução da infecção nos grupos experimentais. Resultados apresentados como média +/- SEM de dois experimentos independentes com n= 6 animais por grupo.

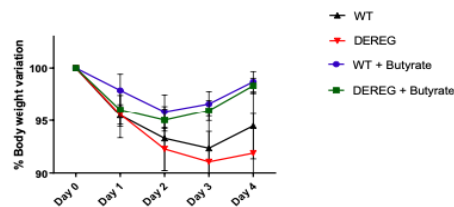


Figura 3: Porcentagem de perda de peso dos grupos experimentais, sendo DEREK os animais com depleção de Tregs e WT os grupos controle. Resultados apresentados como média +/- SEM de dois experimentos independentes com n= 6 animais por grupo.

Animais que receberam tratamento tiveram menor escore clínico e menor perda de peso, mesmo nos grupos DEREK. Isso nos mostra que o efeito protetivo do butirato independe de células T regulatórias.

Quando avaliamos o tamanho do cólon dos animais percebemos que os animais que receberam o tratamento tiveram tendências a ter comprimentos desse órgão maior do que seus controles.

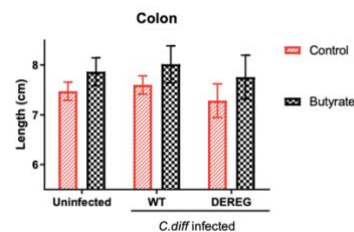


Figura 5: Comprimento do cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais. Resultados apresentados como média +/- SEM de dois experimentos independentes com n= 6 animais por grupo.

Os grupos que receberam tratamento possuem tendências maiores de concentração de células T-regs, principalmente no cólon. Isso ocorre mesmo no grupo DEREK, mostrando que possivelmente o butirato consegue reverter a depleção no contexto de infecção.

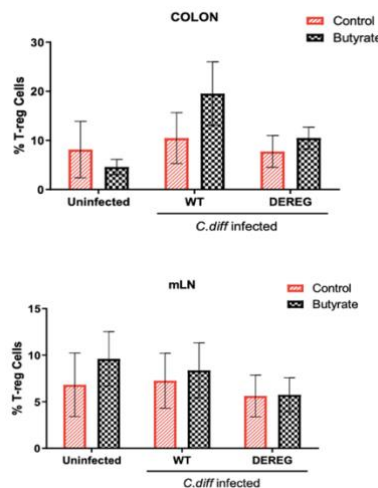


Figura 6: porcentagem de células T-regulatórias CD4+ Fopx3+ CD25+. Análise da porcentagem de Tregs na lamina própria do cólon e no linfonodo mesentérico. Resultados apresentados como média +/- SEM de dois experimentos independentes com n= 6 animais por grupo.

Conclusão

Nossos dados demonstram que o tratamento com butirato modifica a quantidade de células T-regs na lâmina própria. Os animais que receberam tratamento tiveram maior quantidade de T-regs no cólon em comparação com seus controles. O efeito do butirato não é apenas sobre células T-regs, ele atua também em células epiteliais intestinais conforme o mostrado por Chen *et. al* (2019) e em outras células do sistema imune como as TCD4+ naive Singh *et al.* (2014). No nosso modelo experimental o butirato se mostrou um importante estímulo para aumento de populações de T-regs, mesmo quando suas populações foram reduzidas com o uso de alteração gênica e com a toxina diftérica. Análises moleculares complementares e um modelo *in vitro* podem ajudar a entender um pouco mais da ação do butirato neste contexto.