

Efeitos da desnutrição e do seu tratamento com cotrimoxazole na microbiota intestinal e no sistema imune em modelo murino de desnutrição infantil

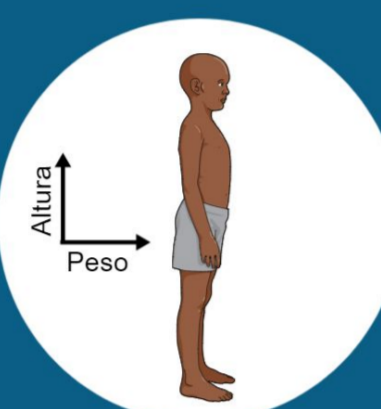
Lucas De Figueiredo Soveral^{1,2}, Lívia Eslabão^{1,2}, Gabriela Gubert^{1,2}, Isis M de Mello^{1,2}, Lucas Beltrame¹, Eduardo L. da Silveira³, Oscar Bruna-Romero^{2,4}, Carlos R. Zárate-Bladés^{1,2}

¹Laboratório de imunoregulação (iREG), Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia (MIP), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); ²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, ³Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina; Brasil lucas-soveral@hotmail.com; zarate.blades@gmail.com

Centro de Controle da Disbiose – CCD – UFSC²

INTRODUÇÃO

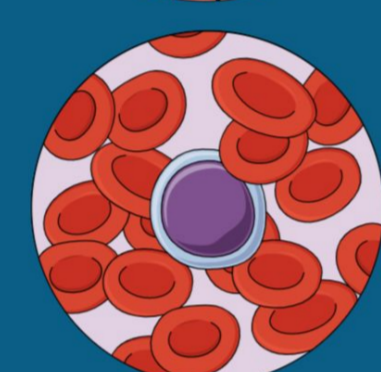
Desnutrição Infantil



Desenvolvimento
A desnutrição infantil interfere no desenvolvimento psico-motor-cognitivo das crianças



Microbiota
Afeta o desenvolvimento de uma microbiota intestinal saudável



Sistema imune
A desnutrição e a disbiose causada por ela podem interferir nas respostas imunológicas

Paradoxo da antibioticoterapia

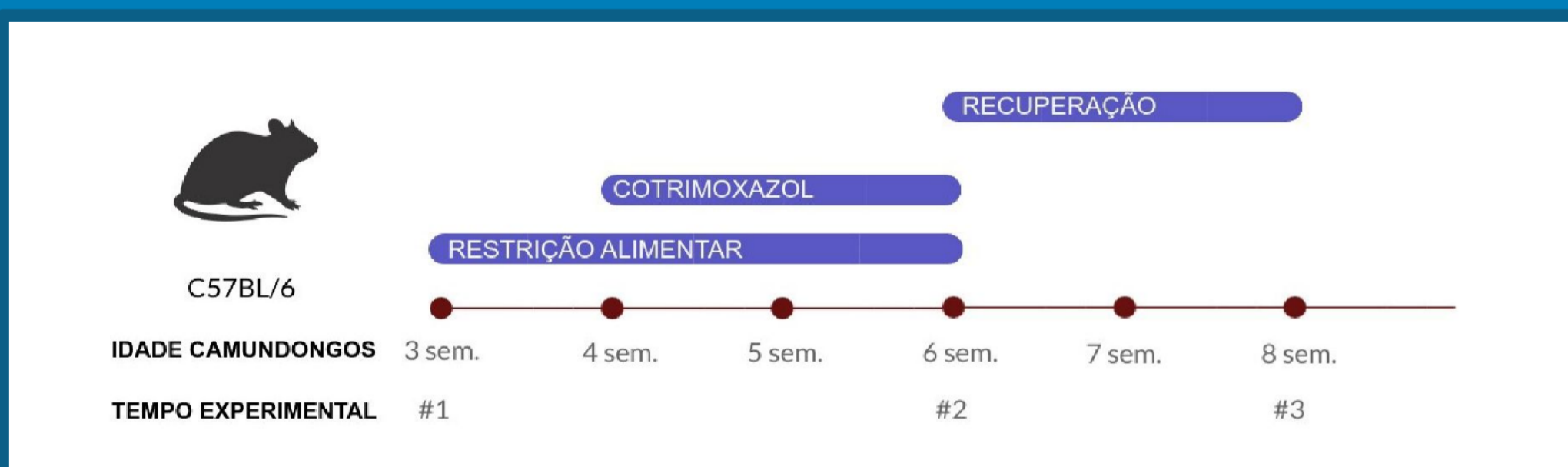
A OMS indica a utilização de antibióticos em crianças passando por processo de desnutrição.

Entretanto, a própria antibioticoterapia resulta em disbiose intestinal.

Gubert (2020) Desenvolveu um modelo consistente para estudar desnutrição infantil em camundongos. Estabão (2021) Demonstrou o efeito da antibioticoterapia na microbiota intestinal de camundongos desnutridos.

Qual o efeito a longo prazo da desnutrição infantil na microbiota e no sistema imunológico?

METODOLOGIA (MODELO)



RESULTADOS

Figura 1. Parâmetros gerais de comprimento dos camundongos

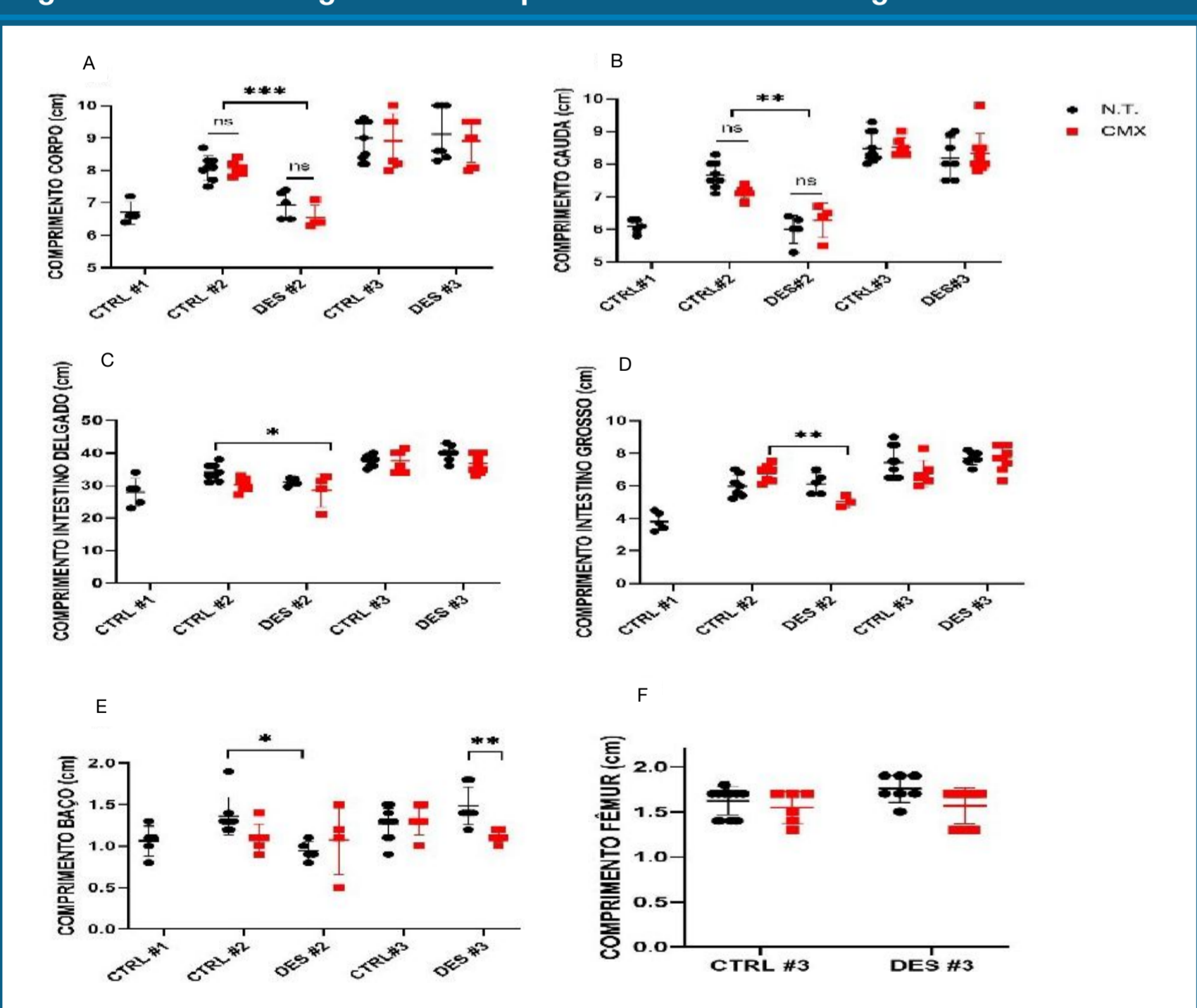


Fig 1. Média ± DP dos parâmetros gerais de comprimento no início do protocolo (#1), ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3). Em preto os grupos não tratados e em vermelho os grupos tratados com Cotrimoxazol. As medidas são apresentadas em centímetros de: (A) corpo; (B) cauda; (C) intestino delgado; (D) intestino grosso; (E) baco; (F) fêmur. Diferença não significativa (ns), *p<0.01, **p<0.001. Foi aplicado ANOVA de duas vias, teste post hoc de Tukey.

Figura 2. Peso dos órgãos de camundongos desnutridos

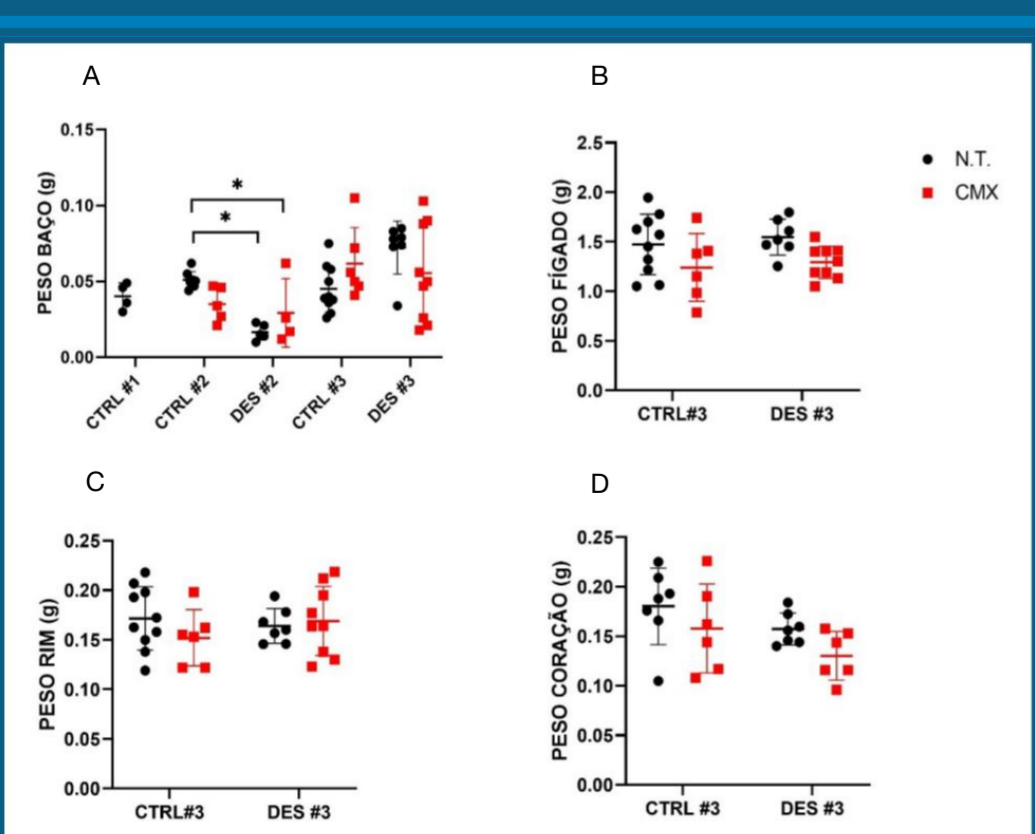


Fig 2. Média ± DP dos parâmetros gerais de peso dos órgãos dos camundongos no início do protocolo (#1), ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3). Em preto os grupos não tratados e em vermelho os grupos tratados com Cotrimoxazol. Valores apresentados em gramas de: (A) baco; (B) fígado; (C) rim; (D) coração. *p<0.1, ANOVA de duas vias, teste post hoc de Tukey. Tempo #1, n=4, Tempo #2 (CTRL n=9, CMX=7, DES n=5, DES+CMX n=4) Tempo #3 (CTRL n=10, CMX n=6, DES n=7, DES+CMX n=10).

Figura 3. Parâmetros bioquímicos dos camundongos desnutridos

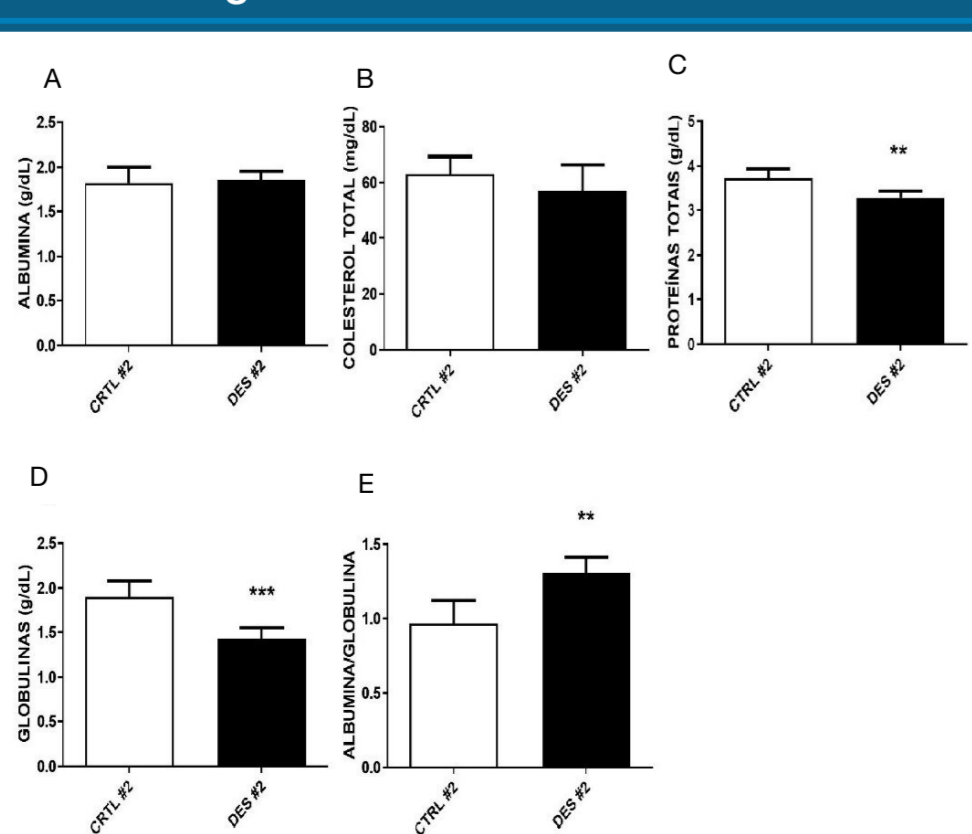


Fig 3. Média ± DP dos parâmetros bioquímicos do sangue de machos controle (CTRL, n=7) e desnutridos (DES, n=4) após a desnutrição #2. (A) Albumina; (B) Colesterol total; (C) Proteínas totais; (D) Globulinas; (E) Relação albumina por globulina. *p<0.001, **p<0.0001, teste T.

RESULTADOS

Figura 4. Parâmetros leucocitários dos camundongos desnutridos

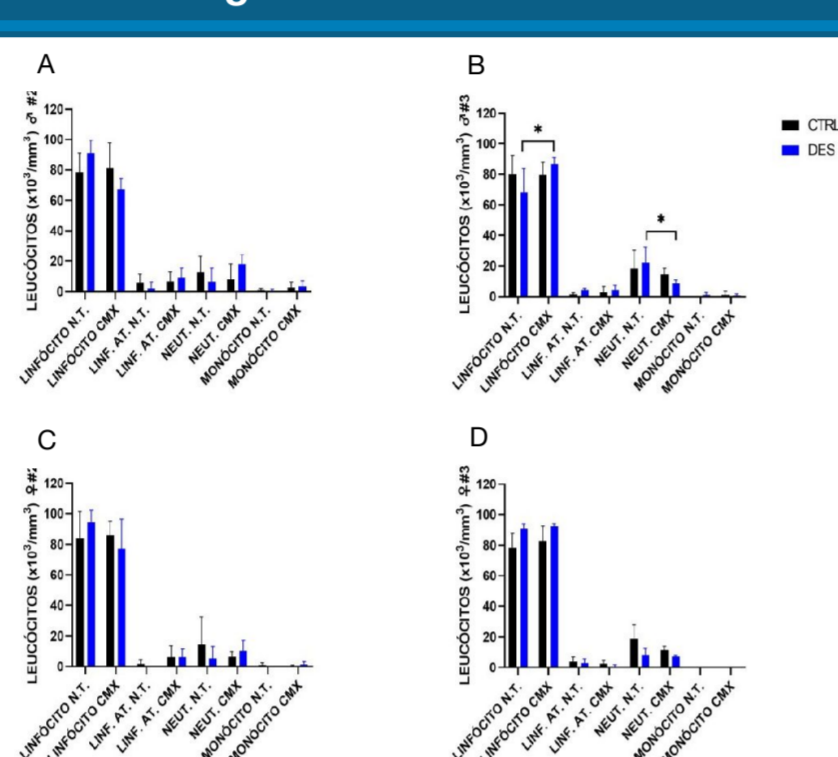


Fig 4. Média ± DP da contagem diferencial de leucócitos dos grupos experimentais ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3) representados em números absolutos por milímetro cúbico. Em azul, os grupos tratados submetidos ao protocolo de desnutrição. (A) Machos #2, (B) Machos #3, (C) Fêmeas #2, (D) Fêmeas #3. *p<0.1, Anovaduasvias, teste post hoc de Tukey. Ma-chos #2 (CTRL n=5, CMX=6, DES n=4, DES+CMX n=3), Fêmeas #2 (CTRL n=6, CMX=4, DES n=5, DES+CMX n=4), Machos #3 (CTRL n=6, CMX n=6, DES n=7, DES+CMX n=7), Fêmeas #3 (CTRL n=6, CMX n=3, DES n=3, DES+CMX n=3)

Figura 6. A relação Firmicutes/Bacteroidetes é alterada pelo protocolo de desnutrição e tratamento com Cotrimoxazolem.

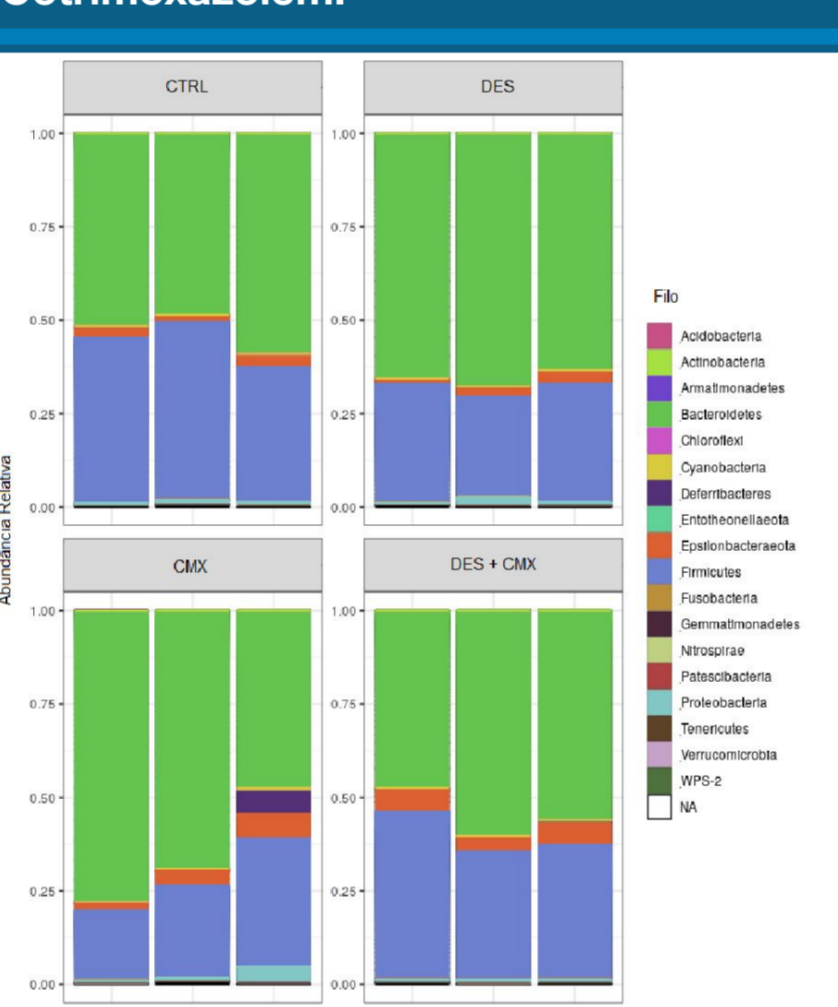


Fig 6. Abundância Relativa de filos nas amostras após a recuperação nutricional (#3) dos grupos CTRL (n=3), DES (n=3), CMX (n=3), DES+CMX (n=3)

Figura 8. A disbiose causada pela desnutrição e pelo uso de Cotrimoxazol é mantida após o protocolo de recuperação.

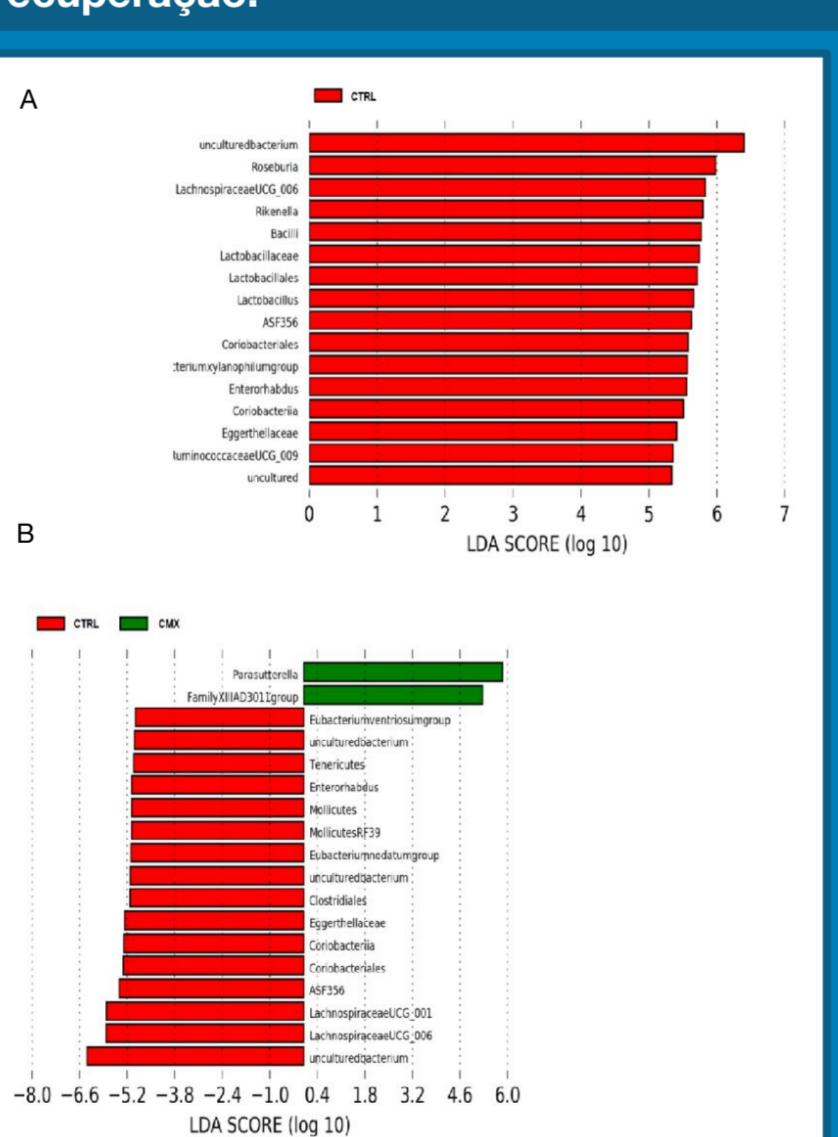


Fig 8. Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LEfSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de machos CTRL (n=3), CMX (n=3), DES (n=3) no tempo experimental #3. Comparação entre grupos: (A) Controle e Desnutrição, (B) Controle e Cotrimoxazol.

Figura 5. A microbiota intestinal dos animais não está completamente madura no início do protocolo de desnutrição

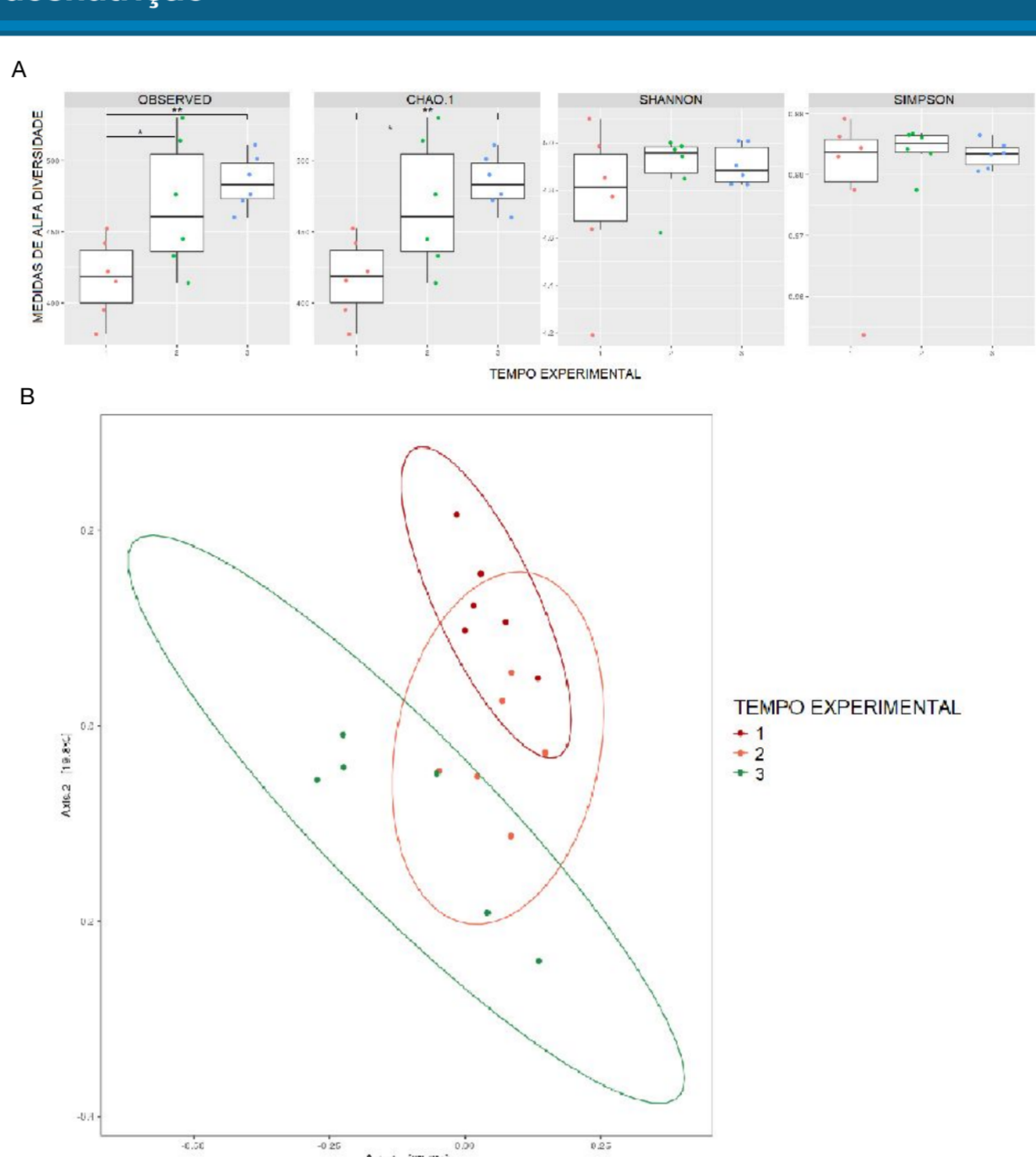


Fig 5. Riqueza, diversidade e abundância relativa de OTUs em amostras de animais machos, após a recuperação (#3), dos grupos CTRL (n=3), DES (n=3), CMX (n=3), DES+CMX (n=3). (A) Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (índices: Observed, Chao1, Shannon, Simpsons) tempos experimentais 1 (vermelho), 2 (verde) e 3 (azul). (B) Análise de Coordenadas Principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis para os animais nos tempos experimentais 1 (vermelho), 2 (laranja) e 3 (verde). *p<0.01, **p<0.001 Anova de umvia, teste post hoc de Tukey.

Figura 7. A recuperação nutricional dos animais não garante a recuperação da composição da microbiota intestinal.

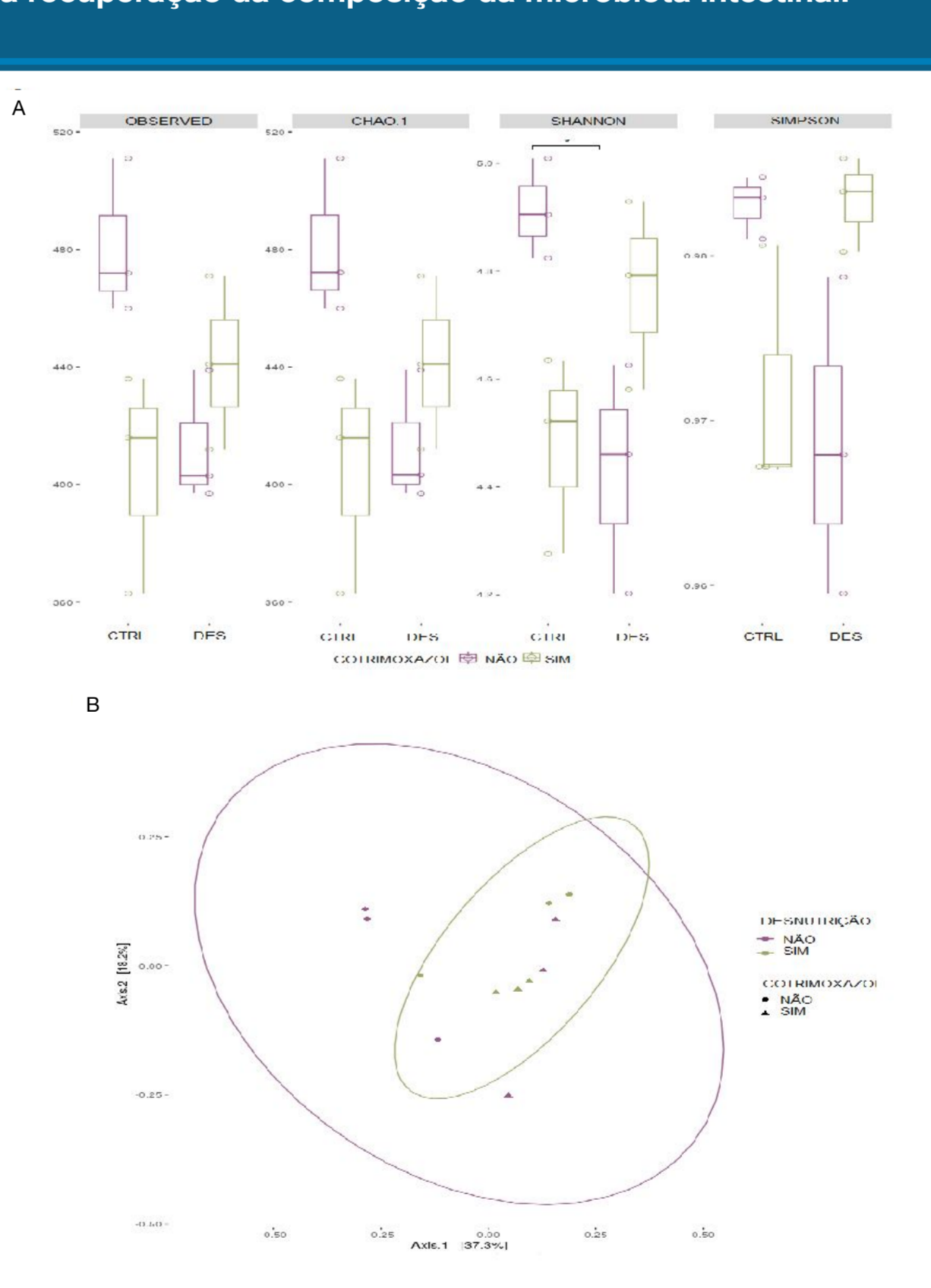


Fig 7. Riqueza, diversidade e abundância de OTUs em amostras de animais machos, após a recuperação (#3), dos grupos CTRL (n=3), DES (n=3), CMX (n=3), DES+CMX (n=3). (A) Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (Observed, Chao1, Shannon, Simpson). (B) Análise de Coordenadas Principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis.

Fig 8. Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LEfSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de machos CTRL (n=3), CMX (n=3), DES (n=3) no tempo experimental #3. Comparação entre grupos: (A) Controle e Desnutrição, (B) Controle e Cotrimoxazol.

RESULTADOS

Figura 9. Efeitos da desnutrição na microbiota logo após a recuperação (8 / 9 semanas)

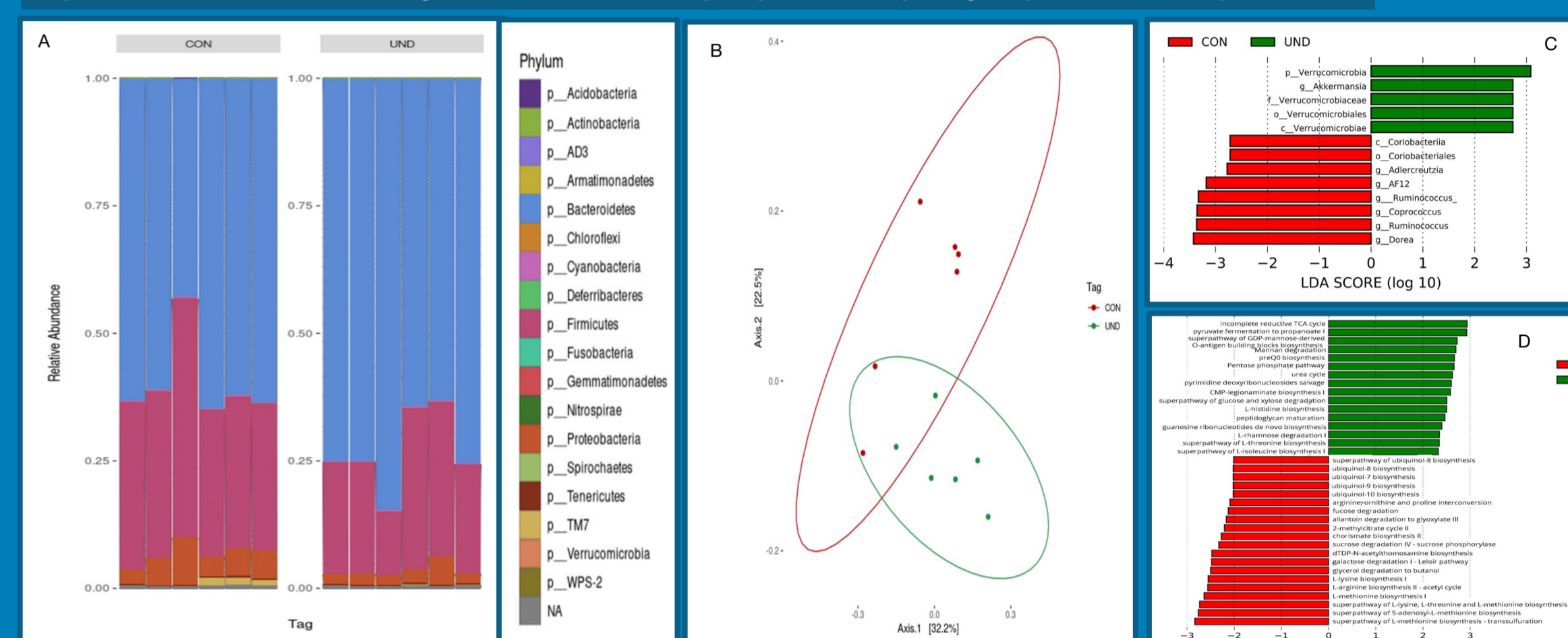


Figura 10. Efeitos da desnutrição na microbiota a longo prazo (27/ 28 semanas)

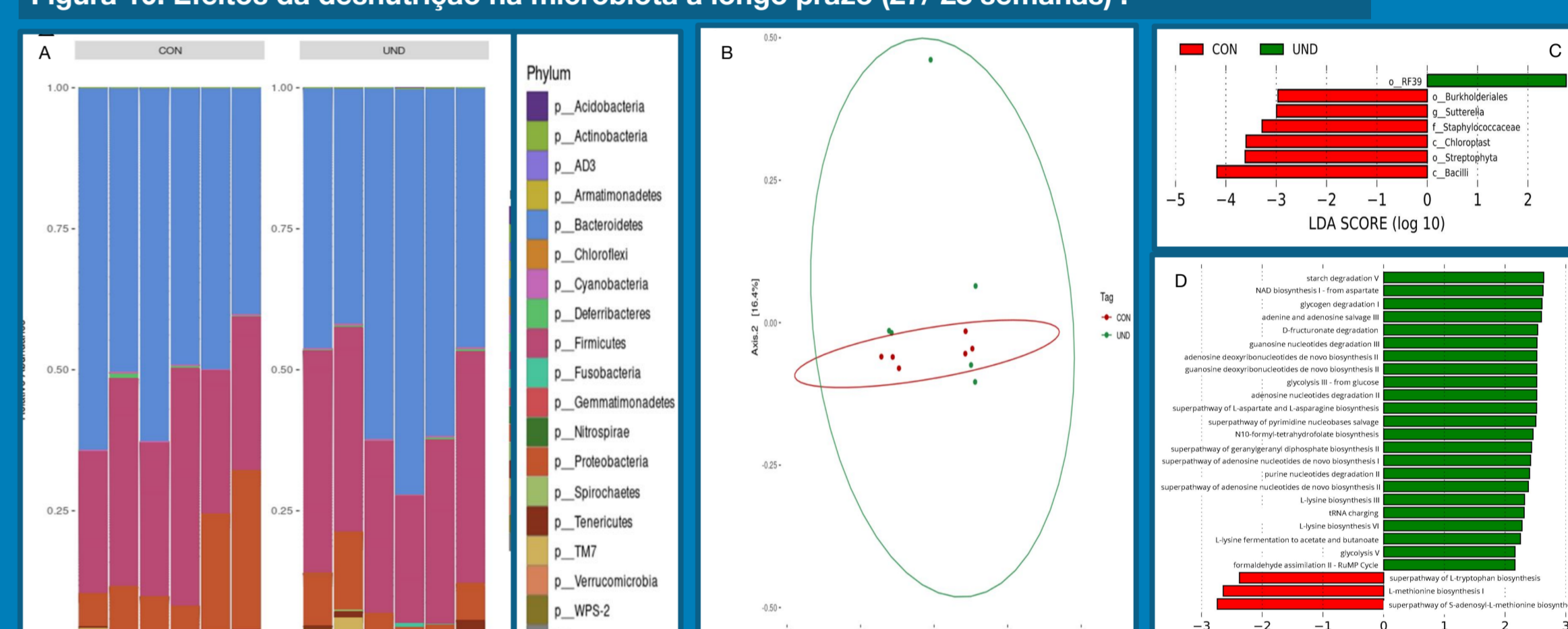


Fig 9. Efeitos da desnutrição na microbiota fecal de camundongos CON (n=6) e UND (n=6) ao final do protocolo de recuperação. (A) Análise da abundância relativa dos filos. (B) Análise de coordenadas principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis para os grupos CON (vermelho) e UND (verde). (C) Análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para composição da microbiota de camundongos CON (n=6) e UND (n=6). (D) Análise discriminante linear (LDA) com (LEfSe) para funcionalidade metabólica da microbiota de CON (n=6) e UND (n=6). A comparação dos animais CON e UND foi realizada por teste t para dados paramétricos e teste U para dados não-paramétricos. Fig 10. Efeitos da desnutrição na microbiota a longo prazo. (A) Análise da abundância relativa dos filos. (B) Análise de coordenadas principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis para os grupos CON (vermelho) e UND (verde). (C) Análise discriminante linear (LDA) com (LEfSe) para composição da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6). (D) Análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para funcionalidade metabólica da microbiota CON (n=6) e UND (n=6). Dados apresentados em score LDA (log10) dos táxons aumentados significativamente (p < 0.05). A comparação entre grupos foi realizada por teste t para dados paramétricos e teste U para dados não-paramétricos.

Figura 11. Efeitos a curto prazo da desnutrição no compartimento de linfócitos B.

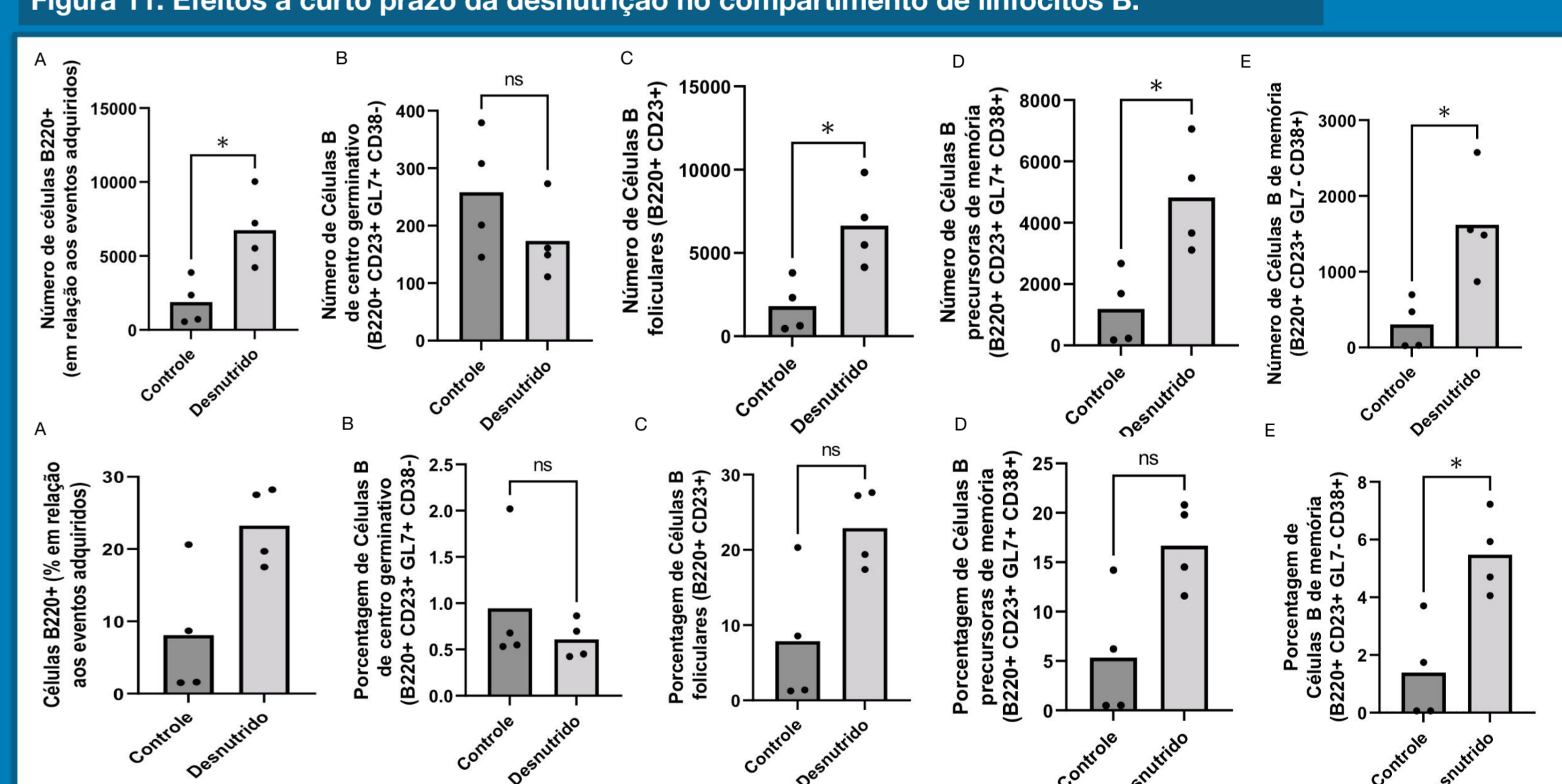


Figura 11. Efeitos a curto prazo da desnutrição na diferenciação de linfócitos B. Imunofenotipagem do compartimento de células B por citometria de fluxo de esplenócitos cultivados. (A) População de células B220+ presentes no cultivo de esplenócitos do grupo controle (n=4) e desnutridos (n=4). (B) População de células B de centro germinativo (B220+ CD23+ GL7+ CD38-) presentes no cultivo de esplenócitos dos controles (n=4) e desnutridos (n=4). (C) População de células B foliculares (B220+ CD23+ GL7+ CD38+) presentes no cultivo de esplenócitos dos controles (n=4) e desnutridos (n=4). (D) População de células B precursoras de memória (B220+ CD23+ GL7+ CD38+) presentes no cultivo de esplenócitos dos controles (n=4) e desnutridos (n=4). (E) População de células B de memória (B220+ CD23+ GL7+ CD38+) presentes no cultivo de esplenócitos dos controles (n=4) e desnutridos (n=4). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste U. Dados apresentados como média. ns - sem significância estatística; * p < 0,05.

CONCLUSÃO

Em geral, desnutrição na infância resulta em disbiose da microbiota intestinal e altera o compartimento de células B a curto prazo, elevando as populações de linfócitos B maduros, de memória, precursoras de memória e foliculares. O tratamento da desnutrição com cotrimoxazole resulta num perfil adicional de disbiose intestinal.

REFERÊNCIAS

- A HILL, D et al. Metagenomic analyses reveal antibiotic induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunology*, v. 3, n. 2, p. 148-156, 25 nov. 2009.
- MANHART, N. *et al.* Influence of short-term protein malnutrition of 115 mice on the phenotype and costimulatory signals of lymphocytes from spleen and Peyer's patches. *Nutrition*, v. 16, n. 3, p. 197-201, mar. 2000
- KAMADA, Nobuhiko; NÓNEZ, Gabriel. Role of the Gut Microbiota in the Development and Function of Lymphoid Cells. *The Journal Of Immunology*, v. 190, n. 4, p. 1389-1395, 1 fev. 2013.

FINANCIAMENTO

Lucas De Figueiredo Soveral é aluno do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia (PPGBTC) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e bolsista FAPESP; Lívia Eslabão, Gabriela Gubert, Isis Maia Apolinário foram alunas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia (PPGBTC) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e receberam bolsa CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)