

# EFEITOS DO ÁCIDO GRAXO BUTIRATO EM QUERATINÓCITOS: ANÁLISES FUNCIONAIS RELACIONADAS COM A PSORÍASE

**Palavras-Chave:** BUTIRATO, PSORÍASE, QUERATINÓCITOS

**Autores(as):**

**RAFAEL DELGADO DE MELO, FCA- UNICAMP**

**ROBERTA NICOLLI SAGIORATO (co-orientadora), FCA- UNICAMP**

**Profa. Dra. HOSANA GOMES RODRIGUES, FCA- UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada pelo aparecimento de placas eritematosas e descamativas, avermelhadas, que afetam cerca de 2 a 4 % da população mundial. Sua etiologia envolve fatores genéticos e ambientais, como infecções e estresse, não havendo cura definitiva e apresentando curso marcado por ciclos de remissão e recidiva. (TORTORA, 2014) (ABBAS, 2019)

Do ponto de vista histológico, a pele consiste em três camadas: a epiderme, composta por células como queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e de Merkel, a derme, formada por tecido conjuntivo mais profundo, e a hipoderme, sendo o tecido subcutâneo. Na psoríase, os queratinócitos, que correspondem a aproximadamente 90 % das células epidérmicas, apresentam diferenciação exacerbada e hiperproliferação decorrentes da ativação imune e, assim, acabam produzindo queratina de forma anormal, o que caracteriza a doença com seus sinais clínicos. (TORTORA, 2014) (ABBAS, 2019)

A ativação imune ocorre a partir de lesões cutâneas que liberam “sinais de alerta” como peptídeos antimicrobianos, DNA extracelular e citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ , que são reconhecidos por células dendríticas e linfócitos T. Estes últimos produzem citocinas como IL-17, IL-22 e TNF- $\alpha$ , que estimulam via receptores, IL-17R, IL-22R, TNFR, as vias de NF- $\kappa$ B e STAT3 nos queratinócitos, levando-os a secretar ainda mais mediadores inflamatórios como IL-36, IL-17C, CXCL1, IL-8, CCL20 e, dessa forma, perpetuar um ciclo autócrino de inflamação. (KAMATA & TADA, 2023)

O manejo clínico da psoríase visa controlar sintomas e reduzir recidivas, lançando mão de terapias tópicas, fototerapia e tratamentos sistêmicos ou biológicos, mas frequentemente a um custo elevado. Nesse contexto, Krejner et al e Costa mostram que o ácido graxo de cadeia curta butirato (C4:0), produzido pela fermentação bacteriana de fibras alimentares, tem se destacado por suas propriedades anti-inflamatórias, uma vez que inibe TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-12, eleva a expressão de IL-10 e restabelece receptores como GPR109a/GPR43 em queratinócitos. Estudos pré-clínicos indicam que o butirato pode modular positivamente a diferenciação e a função de barreira dos queratinócitos, abrindo novas perspectivas terapêuticas para a psoríase. (TROMPETTE, 2022) (KREJNER, 2018) (COSTA, 2016)

Nosso grupo de pesquisa já encontrou resultados positivos referente ao efeito do butirato na psoríase, o que torna possível uma pesquisa mais fundamentada em analisar a possível relação benéfica entre o butirato e especificamente os queratinócitos.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi analisar os efeitos do butirato sobre queratinócitos como possível estratégia terapêutica na psoríase.

## **METODOLOGIA:**

### **Cultura de células**

A linhagem HaCaT, derivadas de queratinócitos epidérmicos humanos espontaneamente imortalizados, foram cultivadas em meio DMEM high glucose contendo 10% de SFB, 1% Penicilina/Streptomicina a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Viabilidade celular**

Para avaliar a viabilidade celular com dois tratamentos, IL-17, citocina inflamatória, simulando um cenário de psoríase e butirato, ácido graxo de cadeia curta sendo estudado. As células HaCaT ( $4 \times 10^4$  células/poço, 150 µL) foram incubadas 72 h a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub>. Em seguida, aplicou-se 100 ng/mL de IL-17 ou butirato (1, 10, 50, 100 µM e 1 mM) por 24 h, mantendo o controle sem tratamento. Após remover o meio, as células foram marcadas com 50 µL de calceína AM (1 µM) e Hoechst (1 mg/mL) por 30 min a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, em escuro. A viabilidade foi medida por fluorescência, já que apenas células intactas convertem calceína AM em calceína fluorescente.

A partir desse ensaio de viabilidade, definimos a concentração de butirato a 1 mM e realizamos outro ensaio de viabilidade celular, dessa vez, com IL-17 (100 ng/mL) + butirato (1mM), simulando um cenário de psoríase em que o butirato é utilizado como tratamento.

### **Ensaio de migração celular (Scratch)**

As células HaCaT foram cultivadas em duplicatas, em placas de 6 poços por 24 h. Após troca do meio, as células foram tratadas com DMEM (controle), tratamento com IL-17 (100 ng/mL) e tratamento com IL-17 (100 ng/mL) + butirato (1mM). O ensaio de migração foi iniciado com a realização de um risco (scratch) linear no centro de cada poço com ponteira de 200 µL. Os poços foram lavados com PBS e adicionou-se meio DMEM com 5 % de soro e mitomicina C para inibir a proliferação celular, garantindo que a redução da área sem células se desse exclusivamente por migração, e não por divisão celular. As imagens foram capturadas nos tempos de 0, 6, 8, 24 e 48 h. A área inicial (0 h) foi usada como referência de 100 % para comparação da migração ao longo do tempo.

### **Ensaio de proliferação**

As células HaCaT foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços e tratados por 24 h IL-17 (100 ng/mL) e IL-17 (100 ng/mL) + butirato (1 mM). Após isso, as células foram fixadas com PFA 4 %, permeabilizadas com Triton X-100 0,5 % e bloqueadas com BSA 5 %. Com isso, foi adicionado anticorpo Ki67 e mantidas overnight. Por fim, foi adicionado DAPI (0,5 ug/mL) e as lamínulas foram montadas com Prolong Gold Antifade. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência e analisadas pelo software Image J, expressando a proliferação como a porcentagem de células KI67+ em relação ao total de células DAPI+.

### **Avaliação da modulação na expressão gênica de marcadores de proliferação por qPCR**

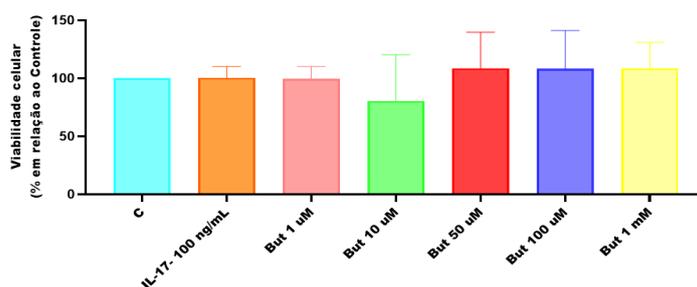
Após os tratamentos, as células HaCaT foram coletadas com Trizol, lisadas nos poços, transferidas para eppendorfs e armazenadas a -80 °C. A extração do RNA foi feita com clorofórmio, isopropanol e etanol 75%, seguida de ressuspensão em água livre de RNase. A integridade foi verificada por gel de agarose 1,5% e a quantificação realizada no espectrofotômetro (Gen5 Take3). Para a síntese de cDNA, foi usado RNA, água livre de RNase, 10x RT Buffer, 25x dNTP (100 MM), 10x Random Primers, Multi label reverse transcriptase, com ciclagem em termociclador. O cDNA foi armazenado a -80 °C.

A PCR em tempo real (qPCR) foi feita com 9 µL de mix contendo água Sigma, Sybr Green, em placa de 96 poços. A análise foi conduzida no software 7500 Fast com método  $\Delta\Delta CT$ , utilizando  $\beta$ -2M como gene de referência. Os genes específicos a serem utilizados serão S100A8, S100A9, Lcn, Krt17, TNF, CXCL1 e CXCL2.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

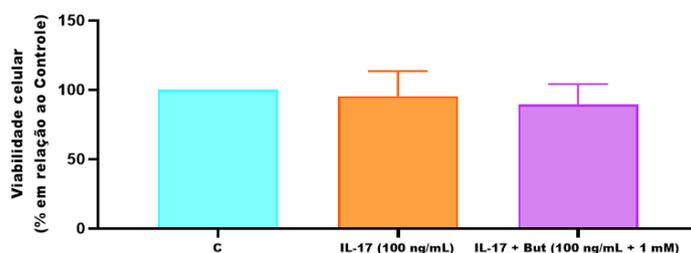
### **Viabilidade celular**

Após avaliarmos a viabilidade celular, não notamos diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle, mostrando que os tratamentos não foram tóxicos para as células (**Figura 1**).



**Figura 1. Viabilidade de HaCaT tratada com IL-17 e Butirato.** Viabilidade celular expressa em % de cada condição em relação ao controle (C). Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo considerados significativos valores de  $p < 0.05$ , por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Os experimentos foram feitos em triplicata, de forma independente, em 5 dias diferentes.

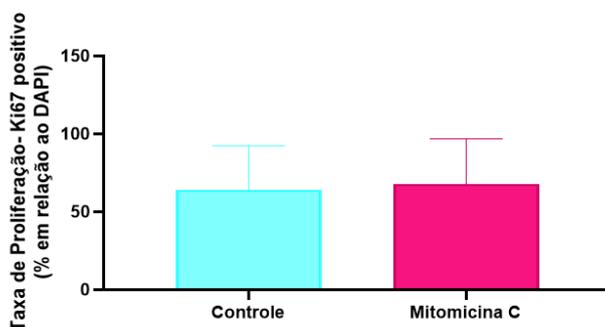
A partir disso, definimos a concentração de butirato a 1 mM e realizamos outro ensaio de viabilidade celular com IL-17 (100 ng/mL) + butirato (1mM) e também não notamos diferença estatística dentre os tratamentos (**Figura 2**).



**Figura 2. Viabilidade de HaCaT tratada com IL-17 e IL-17+Butirato.** Viabilidade celular expressa em % de cada condição em relação ao controle (C). Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo considerados significativos valores de  $p < 0.05$ , por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Os experimentos foram feitos em triplicata, de forma independente, em 6 dias diferentes.

### Ensaio de migração celular (Scratch)

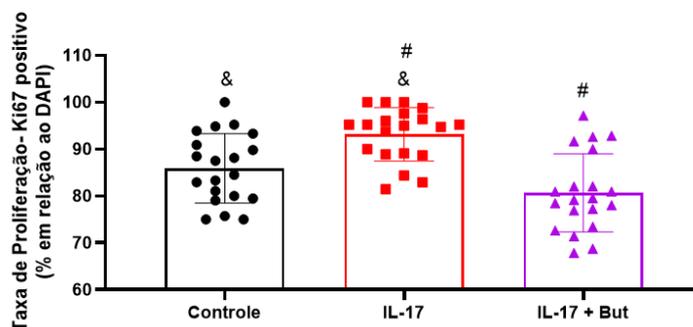
O ensaio de migração foi realizado duas vezes, porém as células mantiveram a proliferação, indicando possível falha na mitomicina C. Para validar esse achado, foi realizado o ensaio de proliferação com marcador Ki67, capturando as imagens em microscópio de fluorescência e analisando-as pelo software Image J. A proliferação foi expressa como a porcentagem de células Ki67+ em relação ao total de células DAPI+, comparando as células tratadas com meio + mitomicina C com o controle (**Figura 3**), o que demonstrou que a mitomicina C não cessou a proliferação, inviabilizando a continuidade do ensaio de migração.



**Figura 3. Proliferação celular (% de células Ki67+/DAPI+).** A proliferação celular foi expressa como a porcentagem de células Ki67 positivas em relação ao total de núcleos corados por DAPI. Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As análises foram feitas em quintuplicata e uma octuplicata, de maneira independente, em 4 dias diferentes.

### Ensaio de proliferação

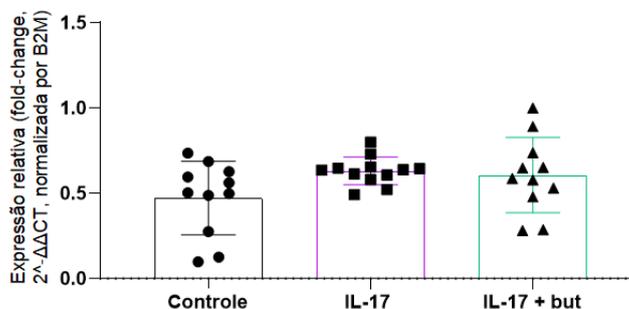
O tratamento com IL-17 aumentou significativamente a proliferação de células Ki67<sup>+</sup> em comparação ao controle ( $p = 0.0073$ ), indicando um aumento da proliferação na presença da citocina. A adição de butirato ao tratamento com IL-17 reduziu a proliferação em relação ao grupo IL-17 isolado ( $p < 0.0001$ ), sugerindo um efeito protetor do butirato, além de que, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo IL-17 + butirato ( $p = 0.0779$ ) (Figura 4).



**Figura 4. Proliferação celular (% de células Ki67<sup>+</sup>/DAPI).** A proliferação celular foi expressa como % de células Ki67<sup>+</sup> em relação ao total de núcleos corados por DAPI. Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo considerados significativos valores de  $p < 0.05$ , por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. As análises foram feitas em quintuplicata, de maneira independente, em 4 dias diferentes. (& = IL-17 vs Controle) (# = IL-17 vs IL-17 + Butirato)

### Avaliação da modulação na expressão gênica de marcadores de proliferação por qPCR

A expressão do gene de referência B2M manteve-se estável entre os grupos controle, IL-17 e IL-17 + butirato. Os valores não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), indicando que o B2M pode ser utilizado de forma adequada como gene endógeno para normalização dos dados. Essa estabilidade confirma a qualidade das etapas de extração de RNA, síntese de cDNA e reação de qPCR (Figura 5).



**Figura 5. Expressão relativa do gene de referência B2M.** Os dados foram analisados por qPCR com base no método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo considerados significativos valores de  $p < 0.05$ , por One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. O experimento foi feito em duplicatas, com 11 amostras para o grupo controle, 12 amostras para o grupo IL-17 e 11 amostras para o grupo IL-17 + Butirato, todas independentes.

### CONCLUSÕES:

Os resultados preliminares desse estudo indicam que o butirato reduz significativamente a proliferação celular induzida por IL-17, sugerindo um potencial efeito anti-inflamatório e modulador. Contudo, um maior número de análises é necessário para validar a atuação do butirato em outros aspectos funcionais dos queratinócitos, como a migração e a expressão de genes inflamatórios.

### BIBLIOGRAFIA

ABBAS, Abul K. *Imunologia Celular e Molecular*. 9. ed., 2019

- Bakshi J, Mishra KP. **Sodium butyrate prevents lipopolysaccharide induced inflammation and restores the expression of tight junction protein in human epithelial Caco-2 cells.** *Cell Immunol.* 2025 Feb;408:104912. doi: 10.1016/j.cellimm.2024.104912. Epub 2024 Dec 21. PMID: 39729961.
- Chen et al. **FGF21 promotes migration and differentiation of epidermal cells during wound healing via SIRT1-dependent autophagy.** *Br J Pharmacol.* 2022 Mar;179(5):1102-1121. doi: 10.1111/bph.15701. Epub 2021 Nov 16. PMID: 34608629.
- COSTA, Neuza Maria B. **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos.** 2. ed., 2016.
- Di Grazia et al. **Temporins A and B stimulate migration of HaCaT keratinocytes and kill intracellular Staphylococcus aureus.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 May;58(5):2520-7. doi: 10.1128/AAC.02801-13. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24514087; PMCID: PMC3993219.
- Fachi et al. **Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism.** *Cell Rep.* 2019 Apr 16;27(3):750-761.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.054. PMID: 30995474.
- Krejner A, Bruhs A, Mrowietz U, Wehkamp U, Schwarz T, Schwarz A. **Decreased expression of G-protein-coupled receptors GPR43 and GPR109a in psoriatic skin can be restored by topical application of sodium butyrate.** *Arch Dermatol Res.* 2018;310(9):751-758. doi:10.1007/s00403-018-1865-1
- Su et al. **Loss of CAR promotes migration and proliferation of HaCaT cells, and accelerates wound healing in rats via Src-p38 MAPK pathway.** *Sci Rep.* 2016 Jan 25;6:19735. doi: 10.1038/srep19735. PMID: 26804208; PMCID: PMC4726158.
- TORTORA, Gerard J. **Princípios de Anatomia e Fisiologia.** 14. ed., 2016.
- Trompette A, Pernot J, Perdijk O, et al. **Gut-derived short-chain fatty acids modulate skin barrier integrity by promoting keratinocyte metabolism and differentiation.** *Mucosal Immunol.* 2022;15(5):908-926. doi:10.1038/s41385-022-00524-9
- Ogawa et al. **Sodium butyrate enhances Fas-mediated apoptosis of human hepatoma cells.** *J Hepatol.* 2004 Feb;40(2):278-84. doi: 10.1016/j.jhep.2003.09.021. PMID: 14739099.
- Wu et al. **Ropivacaine inhibits wound healing by suppressing the proliferation and migration of keratinocytes via the PI3K/AKT/mTOR Pathway.** *BMC Anesthesiol.* 2022 Apr 15;22(1):106. doi: 10.1186/s12871-022-01646-0. PMID: 35428182; PMCID: PMC9011930
- Yuan LL, Cao CY. **Rehmannioside A Inhibits TRAF6/MAPK Pathway and Improves Psoriasis by Interfering with the Interaction of HaCaT Cells with IL-17A.** *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2023 Sep 21;16:2585-2596. doi: 10.2147/CCID.S430621. PMID: 37752969; PMCID: PMC10519428.