

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Efeito de infecção gastrointestinal aguda sobre o
desenvolvimento de
síndrome metabólica induzida por dieta rica em
frutose**

Bernardo de Castro Oliveira

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientadora:

Profa. Dra Denise Morais da Fonseca

São Paulo

2022

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas	1
RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
4. RESULTADOS	13
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS	27
8. ANEXOS	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AKT (PKB)	Proteína Cinase B murina
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CEFAP	Centro de Facilidades e Apoio à Pesquisa
COX-2	Ciclooxigenase 2
DCNT _s	Doenças Crônicas Não-Transmissíveis
DHGNA	Doença Hepatogordurosa Não-Alcoólica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EHNA	Esteatohepatite não-alcoólica
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FXR	Receptor Farnesoide X
GTT	Teste de Tolerância à Glicose (<i>Glucose Tolerance Test</i>)
HBSS	Solução de sais balanceados de Hank (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
ITT	Teste de Tolerância à Insulina (<i>Insulin Tolerance Test</i>)
ILC	Células Linfóides Inatas
ILC1	Célula Linfoide Inata Tbet+
ILC2	Célula Linfoide Inata GATA3+
MLN	Linfonodo Mesentérico (<i>Mesenteric Lymphnode</i>)
NASH	(do inglês Non-alcoholic Steatohepatitis) Dieta hiperlipídica suplementada com frutose
NKT	Células T Natural Killer
NV	<i>Naïve</i>
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SM	Síndrome Metabólica
T2D	Diabetes do tipo 2 (<i>Type 2 Diabetes</i>)
Th1	Linfócito T <i>helper</i> Tbet+
Th2	Linfócito T <i>helper</i> GATA3+
Th17	Linfócito T <i>helper</i> RORyt+
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha)
Treg	Linfócito T regulador
t-SNE	<i>T-distributed Stochastic Neighbor Embedding</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
YP	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

RESUMO

OLIVEIRA, B. C. **Efeito de infecção gastrointestinal aguda sobre o desenvolvimento de síndrome metabólica induzida por dieta rica em frutose.** 2022. no. f. 30. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: Imunologia de Mucosas, Metabolismo, Eixo Intestino-Fígado

O século 21 presenciou o crescimento da incidência de várias doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs), como obesidade, doenças metabólicas, doenças autoinflamatórias e certos tipos de tumores. Determinados comportamentos sociais como sedentarismo e sobrenutrição estão alimentando o aparecimento de algumas destas doenças. De fato, vários estudos têm apontado a emergência das Síndromes Metabólicas (SM). Algumas delas, como diabetes do tipo 2 (T2D), obesidade e dislipidemias possuem características metabólicas intrínsecas, mas também um fator imunológico importante. Neste estudo, procuramos estudar os mecanismos regulatórios bidirecionais entre imunologia e metabolismo envolvidos na progressão de doenças metabólicas, particularmente após a resolução de infecções gastrointestinais. Resultados prévios do nosso grupo mostraram que um único episódio de infecção gastrointestinal aguda pela bactéria *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) induz um remodelamento dos linfáticos mesentéricos, causando extravasamento da linfa e perda de compartimentalização da microbiota e inflamação mesentérica crônica num processo chamado de *Cicatriz Imunológica*. Em paralelo, animais infectados por YP possuem maior ganho de peso, além de inflamação no tecido adiposo e fígado a longo prazo. Portanto, hipotetizamos que determinados episódios de infecção na mucosa intestinal poderiam predispor o hospedeiro ao aparecimento de doenças relacionadas com a SM. **Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi definir se um único episódio de infecção gastrointestinal aguda por YP interfere na progressão da SM induzida por modelo dietético.** Para tal, camundongos C57BL/6 previamente infectados por YP, e após eliminação da bactéria, receberam por 15 semanas dieta controle regular ou dieta hiperlipídica suplementada com frutose (NASH, do inglês Non-Alcoholic Steatohepatitis), conhecida por induzir esteatohepatite não-alcoólica (EHNA) e resistência à insulina. Realizamos medidas de peso semanalmente, e teste glicêmicos de resistência à insulina e tolerância à glicose. Ao contrário da nossa hipótese inicial, camundongos infectados previamente ficaram protegidos da obesidade e T2D induzidos pela dieta: tiveram menor ganho de peso, melhor resposta glicêmica nos testes de tolerância de glicose e insulina, além de menor glicemia em jejum. Quando analisamos o mesentério por citometria de fluxo, encontramos uma diminuição de células que mantêm a homeostase deste tecido: eosinófilos, ILC2 e Th2, além de um aumento de linfócitos B. No fígado dos animais infectados que receberam NASH, a infecção induziu um infiltrado de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ T-bet⁺ em paralelo a um aumento significativo de linfócitos T reguladores (Tregs), particularmente na subpopulação de Tregs Tbet⁺. Isto se refletiu na análise histológica hepática, uma vez que os camundongos infectados tinham menos esteatose hepática. Estes resultados indicam que, apesar dos animais previamente infectados apresentarem um aumento do infiltrado inflamatório no tecido adiposo e fígado após o tratamento com a dieta NASH, a infecção prévia protegeu contra a SM. Nas próximas etapas deste estudo pretendemos estudar a contribuição das Tregs Tbet⁺ neste fenômeno.

ABSTRACT

OLIVEIRA, B. C. **Effect of an acute gastrointestinal infection episode on the development of Metabolic Syndrome induced by a high-fat high-fructose diet** . 2022. no. f. 30. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.
Keywords: Mucosal Immunology, Metabolism, Gut-liver axis

The 21st century has seen the increased incidence of several Noncommunicable Chronic Diseases (NCDs), like obesity, metabolic diseases, autoinflammatory diseases and several kinds of tumors. Social behavior like sedentarism and overnutrition fuels the appearance of these diseases. In fact, some studies indicate the emergence of the Metabolic Syndromes (MS). Some of them, like type 2 diabetes, obesity and dyslipidemias have intrinsic metabolic property, but also an important immunological factor. In this study, we look to shed light on the bidirectional regulatory mechanisms between immunology and metabolism, specially after the resolution of gastrointestinal infections. Previous results from our group show that a single episode of acute gastrointestinal infection caused by the bacteria *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) induces a remodeling of the mesenteric lymphatics, causing lymph leakage and loss of microbiota compartmentalization that leads to chronic inflammation in a process called *Immunological Scar*. In parallel, mice infected by YP show increased weight gain, and long-term adipose tissue and liver inflammation. Therefore, we hypothesized that episodes of infection on the intestinal mucosa could predispose the host to the development of MS-related diseases. **Thus, our main objective was to define if a single episode of gastrointestinal infection can interfere the progression of MS induced by a diet model.** C57BL/6 mice were infected with YP and, after bacterial clearance, received high-fat high-fructose diet (NASH diet) that is known to induce Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) and insulin resistance for 15 weeks. We measured weight gain weekly and also glucose and insulin tolerance tests. Despite our initial hypothesis, infected mice became protected from obesity and T2D induced by NASH diet: they had lower weight gain and a better glycemic response in the glucose and insulin tolerance tests, and also lower fasting glucose. We analyzed the mesenteric adipose tissue by flow cytometry and found a reduction of cells that maintain the homeostasis in this tissue: eosinophils, ILC2 and Th2. In the liver of infected mice after NASH diet, we found a CD4⁺ and CD8⁺ Tbet⁺ infiltrate, but also a significant increase on Treg cells, specially the Treg Tbet⁺ subpopulation. This reflected on liver histology, when we saw that mice infected had less steatosis after receiving NASH diet. Together, this results show that beside having adipose tissue and liver inflammation, previously infected mice were protected from MS induced by NASH diet. On the next steps of this project, we intend to study the contribution of Treg Tbet⁺ infiltration on this phenotype.

1. INTRODUÇÃO

Enquanto o século XXI emergiu com avanços tecnológicos em diversas áreas, incluindo na saúde, a sociedade atual ainda enfrenta desafios neste campo, principalmente com a emergência das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs), como hipertensão, diabetes, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias crônicas. Os comportamentos sociais da atualidade incluindo a falta de atividade física, o sedentarismo e a sobrenutrição, assim como o envelhecimento populacional, contribuem para o surgimento destas condições. Um dos principais grupos de DCNTs é aquele que inclui a Síndrome Metabólica (SM): obesidade, diabetes, hipertensão, dislipidemias, entre outras. Um indivíduo é considerado em SM quando apresenta 3 ou mais das condições citadas. Um estudo recente declarou que 25,8 milhões de crianças e 35,5 milhões de adolescentes vivem com SM no mundo (NOUBIAP *et al.*, 2022). De fato, a prevalência de obesidade chega a 20% no Brasil e a quase 40% nos Estados Unidos (BLÜHER, 2019). Em 2045 é esperado que 693 milhões de pessoas vivam com diabetes, sendo que quase metade desta quantidade não é diagnosticada (CHO *et al.*, 2018). Podemos verificar que há ainda muitas dificuldades em diagnosticar e tratar estas condições precocemente e apesar de muitos estudos relacionados, pouco ainda se sabe sobre o surgimento e fatores que influenciam a progressão das DCNTs. Isto nos levou a procurar por um mecanismo que afete a progressão destas doenças. Acreditamos que fatores ambientais, como a exposição a patógenos e alterações na composição da microbiota decorrente de tais infecções, possam contribuir para a progressão da SM induzida por alterações na dieta.

Apesar das melhorias nas condições de higiene populacional, as infecções agudas nos tecidos de barreira ainda são muito comuns. Estimativas indicam que 93 milhões de pessoas são infectadas por *Salmonella* spp. anualmente, com 155 mil mortes associadas (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2019). Casos de infecção por *Shigella* spp. são responsáveis por 212 mil mortes anualmente, sendo 63.700 de crianças (KHALIL *et al.*, 2019), e casos de *Escherichia coli* enterotoxigênica são responsáveis por 51 mil mortes anualmente sendo 18.700 crianças (KHALIL *et al.*, 2019). No Laboratório de Imunologia de Mucosas – ICB/USP, desenvolvemos um modelo experimental para estudar consequências a longo prazo de infecções gastrointestinais agudas. Como camundongos apresentam resistência ou suscetibilidade exacerbada aos patógenos gastrointestinais

humanos mais comuns, padronizamos uma infecção aguda pela bactéria *Yersinia pseudotuberculosis* (FONSECA *et al.*, 2015). Neste modelo, a infecção tem duração de duas semanas, e consideramos que a partir da quarta semana pós-infecção que o clearance total da bactéria tenha sido efetuado não. Este será o modelo de infecção aguda que utilizaremos no presente projeto.

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para o estudo de SM, incluindo o uso de dietas hiperlipídicas. Neste trabalho, utilizaremos o tratamento crônico com a dieta NASH: uma dieta hiperlipídica (com altas concentrações de lipídeos, 40%) com acréscimo de 20% de frutose para a indução da SM. Camundongos que recebem esta dieta, além de obesidade e T2D, possuem uma condição que afeta o fígado: a esteatohepatite não-alcoólica (EHNA). A EHNA é uma etapa do espectro da Doença Hepatogordurosa Não-Alcoólica (DHGNA), que pode ser considerada como uma condição que faz parte da SM. Apesar de ser menos citada, a DHGNA é uma doença silenciosa cuja a primeira fase é caracterizada por esteatose hepática: acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos que é reversível. Na segunda fase, chamada de esteatohepatite, acontece um processo inflamatório e de morte celular irreversível, culminando na destruição dos hepatócitos e substituição de tecido hepático por tecido fibroso, que caracteriza a terceira fase: cirrose hepática (SHEKA *et al.*, 2020). A EHNA também é um dos principais fatores de risco para a ocorrência de câncer hepático. Apesar de não ser o foco principal do projeto, durante sua realização buscaremos caracterizar melhor a etiologia do processo inflamatório que ocorre no fígado e as consequências metabólicas de camundongos que recebem essa dieta.

Conforme descrito acima, um dos pontos que acreditamos que pode mediar o surgimento das DCNTs, como a SM induzida pela dieta NASH, está na perturbação da homeostase intestinal e dos órgãos associados, como o mesentério. A mucosa intestinal é uma das principais interfaces de barreira com o ambiente externo e, em condições normais, coexiste em equilíbrio com os nutrientes da dieta e microrganismos comensais (ESTERHÁZY *et al.*, 2019). Infecções agudas na mucosa intestinal representam perturbações teciduais frequentes e intensas das quais os órgãos afetados precisam se recuperar rapidamente para que não haja prejuízo funcional (FONSECA *et al.*, 2015; HAND *et al.*, 2012), em particular, devido ao fato de que patógenos, micro-organismos

comensais e antígenos ambientais compartilham transitoriamente o mesmo microambiente inflamatório (HA *et al.*, 2020). Visto que, para que haja eliminação do patógeno, respostas regulatórias são geralmente inibidas durante tais infecções (MATHARU *et al.*, 2009), estes encontros podem interferir na capacidade do sistema imunológico em distinguir componentes benignos versus patogênicos e elementos próprios versus não-próprios o que pode levar à indução e manutenção de inflamação tecidual crônica mesmo na ausência do patógeno (FONSECA *et al.*, 2015; HA *et al.*, 2020, PEYRIN-BIROULET *et al.*, 2012).

Em resultados publicados anteriormente, nosso grupo mostrou que um único episódio de infecção aguda por *Y. pseudotuberculosis* pode afetar de maneira irreversível a homeostase e imunidade na mucosa intestinal através de um fenômeno que chamamos “cicatrização imunológica” que inclui remodelamento do mesentério, interrupção do diálogo mucosa intestinal-hospedeiro e perda de compartimentalização da microbiota intestinal (FONSECA *et al.*, 2015). Além disso, a “cicatriz imunológica” causa um processo de dano nos vasos linfáticos mesentéricos, e, conseqüentemente, o extravasamento de linfa para o tecido adiposo mesentérico (FONSECA *et al.*, 2015). Este fenômeno de disfunção linfática no tecido adiposo mesentérico já foi mostrado anteriormente (CZEPIELEWSKI *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2021). Nestes estudos anteriores, o dano linfático se dava em meio a contextos inflamatórios, pela maior produção de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) ou pela indução da expressão de COX-2 (ciclooxigenase 2) no tecido adiposo mesentérico.

Sabemos, portanto, que episódios de infecção gastrointestinal podem levar à inflamação no tecido adiposo mesentérico, entretanto, não se sabe qual o impacto de tais eventos sobre órgãos/tecidos distantes do sítio infeccioso. Esta questão torna-se ainda mais importante no cenário atual de aumento da incidência de doenças inflamatórias sistêmicas e doenças metabólicas, uma vez que obesidade está relacionada à inflamação do tecido adiposo (WEISBERG *et al.*, 2003) que leva ao conseqüente aparecimento de resistência à insulina (OSBORN *et al.*, 2021), uma das principais características da diabetes mellitus tipo 2 e da SM. Dessa forma, a hipótese desse projeto é que infecções agudas podem levar a perda de compartimentalização da microbiota intestinal, promovendo uma inflamação crônica em sítios distantes à infecção inicial, como o tecido

adiposo e o fígado e assim predispondo o indivíduo desenvolver SM de forma mais rápida ou mais gravemente. Dessa forma, nesse projeto utilizaremos o modelo experimental de cicatrização imunológica induzida pós-infecção por *Y. pseudotuberculosis* para estudar o efeito de infecções gastrointestinais agudas sobre o desenvolvimento de SM, em particular da obesidade e T2D, induzidos por um modelo de dieta NASH.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Determinar se infecção prévia por *Y. pseudotuberculosis* afeta a progressão de SM induzida por dieta hiperlipídica suplementada com frutose.

- **Objetivos Específicos:**

- 1 - Determinar o perfil metabólico de camundongos infectados por *Y. pseudotuberculosis* após modelo de SM
- 2 - Caracterizar o infiltrado inflamatório no fígado dos animais infectados após dieta NASH
- 3 - Caracterizar a resposta imune no mesentério após infecção por *Y. pseudotuberculosis*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Camundongos C57BL/6 fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas e peso maior que 18g obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP foram utilizados. Os camundongos foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo (ICB-USP), sob o protocolo CEUA-ICB 49/2016. A eutanásia dos animais foi realizada por dosagem excessiva do anestésico isoflurano.

3.2 Infecção oral

A bactéria *Y. pseudotuberculosis* (cepa IP32777) foi cultivada em meio 2XYT a 25° C por 18h. Para quantificação das bactérias viáveis, foi medida a densidade óptica da cultura, interpolada em curva previamente padronizada no laboratório. Os camundongos

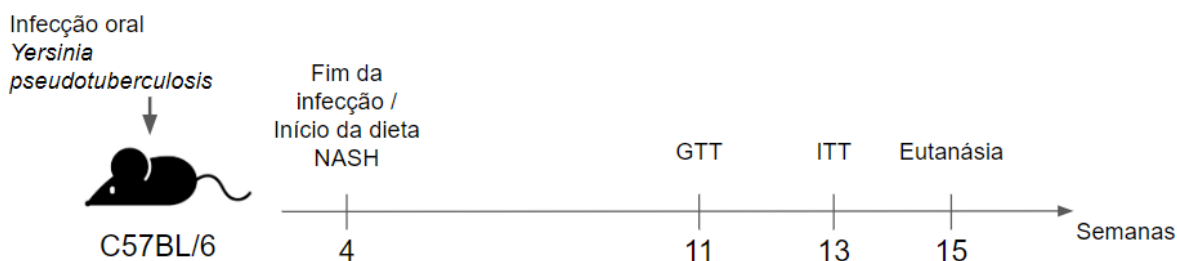
foram submetidos à jejum de 12h no dia anterior à infecção, e receberam 1×10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) da bactéria pela via oral por gavagem.

3.3 Dieta Especial

Como modelo de desordem metabólica, camundongos C57BL/6 foram alimentados por 15 semanas com uma dieta hiperlipídica suplementada com frutose (20%), que causa esteato-hepatite não alcoólica (NASH). Todas as dietas foram produzidas e comercializadas pela empresa Rhooster.

Dieta	Controle	NASH
Carboidratos (%)	63,9	21,66
Lipídeos (%)	17,2	23,2
Proteínas (%)	18,8	42,89

Tabela 1: Principais componentes das dietas utilizadas: controle e hiperlipídica suplementada com frutose (NASH). Dados em porcentagem



Delineamento 1: Modelo de síndrome metabólica e esteatohepatite não-alcoólica (NASH). Os animais foram tratados com dieta NASH (hiperlipídica e rica em frutose) ao longo de 15 semanas e os testes metabólicos foram realizados nos períodos indicados. Colesterol e glicemia séricos foram medidos na quarta semana. Teste de tolerância à glicose (GTT) na 10ª semana e teste de sensibilidade à insulina (ITT) na 13ª semana. Eutanásia foi realizada na 15ª semana.

3.4 Testes metabólicos

Para medir os níveis de colesterol sérico, os animais foram mantidos em jejum noturno por 12h. O Teste de Tolerância à Glicose (GTT) foi feito com os camundongos também em jejum de 12h. Foi realizada a injeção de glicose pela via intraperitoneal (2g/Kg) e a glicemia no sangue foi medida nos minutos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 após a injeção de glicose. O Teste de Tolerância à Insulina (ITT) foi realizado com os animais sob jejum de 6h. Para normalizar a ingestão alimentar, os animais foram mantidos em jejum noturno por

12h, seguido de reposição da ração por 3h para então serem submetidos a 6h de jejum. Pela via intraperitoneal foi injetada a insulina (0,75U/Kg) e mediu-se a glicemia nos minutos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30, 60, 90 e 120. A medição da glicemia foi realizada com auxílio do aparelho AccuChek (Roche).

5.5 Histologia

Os animais que receberam dieta hiperlipídica suplementada com frutose (NASH) tiveram o lóbulo caudado do fígado retirado, fixado em formol tamponado 10% para processamento de rotina em blocos de parafina. O tecido foi seccionado em cortes de 5µm e foi utilizada coloração de hematoxilina e eosina (HE) para a análise histopatológica.

5.6 Isolamento de leucócitos do pâncreas e do fígado

Após eutanásia, o mesentério e o fígado foram coletados e processados para citometria de fluxo. O mesentério foi separado do omento, pâncreas e dos linfonodos mesentéricos antes de ser transferido para solução de digestão de meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma) contendo 1% de Albumina Sérica Bovina (BSA, bioWorld), colagenase IV (Sigma) (0,5mg/mL) e DNase I (Sigma) (0,25mg/mL). Após incubação sob agitação e por 25min a 37°C, foi adicionada uma solução de DMEM contendo 1% de BSA e EDTA (Nova Biotecnologia) a 5µM. As amostras foram centrifugadas à 1600rpm por 10min à 4°C e ressuspensas com RPMI (Sigma) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina, penicilina/estreptomicina e β-mercaptoetanol (Hyclone). Após essa etapa, as células foram contadas e submetidas ao protocolo de marcação para análise por citometria de fluxo.

O fígado dos animais, após ser separado de um lóbulo, foi transferido para solução de digestão em meio RPMI contendo 0,5µg/mL de colagenase IV e 0,25µL/mL de DNase I. Após digestão por 25min a 37°C, o tecido foi macerado, filtrado em *cell strainer* de 70µm e a suspensão celular obtida foi ressuspensa em Percoll 37,5% (GE Healthcare) diluído em HBSS (Hyclone). As amostras foram então centrifugadas a 1700rpm por 20min, seguido de 2 lavagens com RPMI/SFB 3%. Após essa etapa, as células foram ressuspensas com RPMI contendo 5% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina, penicilina/estreptomicina e β-mercaptoetanol. Após essa etapa, as células foram contadas

e submetidas ao protocolo de marcação para análise por citometria de fluxo.

5.7 Citometria de fluxo

Para identificar por citometria de fluxo as células que se encontravam no sangue das que se encontravam no parênquima hepático, empregamos um método que consiste na injeção de anticorpo anti-CD45 conjugado com fluorocromo por via intravenosa (Delineamento 2). Realizamos a eutanásia dos animais após 3min da inoculação de 2µL do anticorpo diluído em 200µL de salina estéril, período suficiente para que o anticorpo se ligasse na superfície das células circulantes, mas não penetrasse no parênquima tecidual.



Delineamento 2. Identificação das células presentes na vasculatura e das células no parênquima hepático. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano 3 minutos antes da eutanásia, e receberam por via intravenosa anticorpo anti-CD45 (FITC). Após a eutanásia, o fígado foi retirado e processado, marcando-se as células presentes com outro anticorpo anti-CD45 (BV650). Dessa forma separamos as células do sangue (CD45+/CD45 IV+) das células do tecido (CD45+/CD45 IV-).

Para análise dos diferentes tipos celulares encontrados nas amostras, dividimos os anticorpos utilizados em 2 painéis diferentes: um painel de marcação de superfície para identificar as células mieloides e os linfócitos B e um painel de marcação de fatores de transcrição.

Após a extração das populações celulares do fígado ou do pâncreas, foram feitas marcações para a imunofenotipagem de células do sistema imune inato (neutrófilos, eosinófilos, DCs, macrófagos e monócitos e células linfoides inatas) e análise do infiltrado linfocitário (linfócitos T CD4 e T CD8, linfócitos B, linfócitos TCRγδ), além da avaliação do perfil de produção de citocinas por essas células. Para marcação de superfície, as células extraídas foram transferidas para uma placa de fundo “U” de 96 poços e lavadas com tampão HBSS. Na placa no qual a marcação de células do sistema imune inato foi realizada, adicionou-se 10µL de suspensão contendo 3000 *beads* fluorescentes para contagem celular (Beckman Coulter®; Brea, Califórnia, EUA). Posteriormente a

centrifugação da placa, realizou-se a marcação de viabilidade celular utilizando a sonda *Live/Dead* (LD) (Invitrogen™ *Molecular Probes*) em tampão HBSS, por 20min a 4°C, sob proteção da luz. Posteriormente, as células foram lavadas em tampão FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*/ PBS + 2% SFB), seguido da adição de 30µL/poço da mistura de anticorpos em tampão FACS, por 30min a 4°C, sob proteção da luz. Após o término da incubação, a placa foi lavada com tampão FACS, e nos casos em que não havia marcação intracelular, passou-se para a etapa de fixação com paraformaldeído (Sigma) a 2%, por 20min à temperatura ambiente.

Para a fração celular no qual haveria marcação intracelular, as células marcadas para as moléculas de superfície foram ressuspensas em tampão de fixação (eBioscience™ – Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) e incubadas por 60 min a 4°C, sob proteção da luz. Após incubação, a placa foi lavada com tampão FACS. Posteriormente, lavou-se com tampão de permeabilização celular (*Perm Wash* - eBioscience™), seguida da adição da mistura dos anticorpos intracelulares em tampão de permeabilização e incubação por 30min a 4°C, sob proteção da luz. Após a placa foi lavada com *Perm Wash* e FACS e as células ressuspensas em 200µL de tampão FACS.

Os anticorpos utilizados são descritos na tabela abaixo:

Anticorpos	Fluorocromos	Clones
SiglecF	PE	1RNM44N
F4/80	PE-Cyanine7	BM8
CD103	APC	2E7
MCH II	AF700	M5/114.15.2
TCR-β	AF780	H57-597
CD64	BV421	10.1
CD11b	BV 605	M1/70
CD45	BV650	30-F11
CD45	BV421	30-F11
CD11c	BV785	N418
Ly6G	PE-TR	1A8
GATA-3	FITC	L50-823
FoxP3	PE	FJK-16s
RORgt	PERCP	B2D
Tbet	APC	eBio4B10
CD8	AF700	RPA-T8
CD4	BV605	RM4-5
NK1.1	BV650	PK136
Thy1.2	BV785	30-H12

Após marcação, as amostras foram adquiridas em citômetro BD LSRFortessa – X20, localizado no Centro de Facilidades e Apoio à Pesquisa – CEFAP, ICB/USP. Todas as análises de citometria foram feitas com o auxílio do software FlowJo®. As estratégias de *gates* estão descritas no **anexo 2**.

Para análise de citometria utilizamos o método de redução de dimensionalidade chamado t-SNE (*T-distributed Stochastic Neighbor Embedding*), realizado através do software FlowJo® em que juntamos todos os eventos de todas as amostras em um único arquivo (concatenado) a partir da população de leucócitos vivos (DownSample - CD45+/LD-). Aplicamos o algoritmo t-SNE nessa única população (3000 interações, 50 perplexidade) para separar os eventos que expressam marcadores de forma semelhante e assim obter uma distribuição das diferentes populações em um mesmo gráfico.

5.9 Protocolo de ELISA

IFN γ : Placas específicas para o ensaio imunoenzimático (ELISA) de 96 poços foram revestidas com 100 μ L de tampão de *coating* carbonato de sódio 0,1M (pH = 9,5) e o anticorpo de captura diluído à 1:250 e incubadas *overnight* à 4°C. Após lavar cinco vezes com tampão de lavagem (PBS + Tween-20 (LGC Biotecnologia) 0,05%), as placas foram bloqueadas com solução de PBS e SFB 10% e incubadas em temperatura ambiente por 1h. Após 5 lavagens, foram pipetados 100 μ L das amostras de homogenato, sem diluição, e a curva de calibração, por diluição seriada, com primeiro ponto à 400pg/mL. O limite de detecção foi de 25,382 pg/mL. As amostras e curva foram então incubadas por 2h e lavados por mais 5 vezes. Foi adicionado a solução contendo anticorpo de detecção em concentração de 1:500 e streptoavidina em concentração de 1:250, incubando por 1h. Após mais 7 lavagens foi adicionado 100 μ L do tampão substrato (Tetrametilbenzidina (TMB) + peróxido de hidrogênio, BD) e após 30min no escuro, a reação foi parada adicionando 50 μ L de solução de ácido sulfúrico (LGC Biotecnologia) a 2M. A absorbância foi lida à 450nm, subtraindo a absorbância à 570nm.

5.10 Análise estatística

Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa *GraphPad Prism 7.0*. Os dados foram expressos a partir da média \pm erro padrão da média e os resultados

comparados utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. Para dados não paramétricos, foi realizado o teste T Student, seguido do teste de Mann Whitney. Foram considerados valores estatisticamente significativos aqueles a partir do $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Resultados prévios do laboratório mostram que a infecção com *Y. pseudotuberculosis* (YP) foi capaz de imprimir uma vantagem metabólica no hospedeiro de maneira microbiota-dependente, caracterizada por uma melhora na sensibilidade à insulina. Por meio de um teste de fosforilação de AKT, verificamos que esta melhora na sensibilidade à insulina ocorria no tecido adiposo e no músculo, mas não no fígado dos animais previamente infectados (Siqueira et al, *under review*). A infecção também foi capaz de induzir um padrão de infiltrado inflamatório crônico no fígado, caracterizado não apenas pela presença de células de padrão Th1, como também Th17 e um infiltrado neutrofílico. (Oliveira et al, *unpublished*). Tais resultados foram obtidos em animais tratados com dietas controle e não expostos a outros desafios ambientais. Por isso, hipotetizamos que o tratamento dos animais infectados com a dieta NASH (que desafiaria a função hepática destes animais) levaria a uma exacerbação da resposta inflamatória que iria se sobrepor às vantagens metabólicas conferidas pela infecção.

Camundongos C57BL/6 foram infectados e, após 4 semanas, iniciamos o tratamento com a dieta NASH. Ao contrário da nossa hipótese inicial, verificamos que os animais infectados que receberam a dieta NASH apresentaram uma redução significativa no ganho de peso em comparação aos animais não infectados quando tratados com a mesma dieta (**Figura 1A**). Em seguida, realizamos os testes metabólicos e observamos que os animais infectados tratados com a dieta NASH possuíam uma melhor resposta à insulina quando realizamos o ITT (**Figura 1B**), melhor *clearance* de glicose no GTT, apresentando menor área sobre a curva (**Figura 1C**), e menor concentração de glicose no sangue em jejum de 12h quando comparados aos camundongos não infectados que receberam a dieta NASH (**Figura 1D**). É possível inferir, portanto, que a infecção por *YP*

foi capaz de induzir resistência a longo prazo ao modelo de SM causada por dieta NASH.

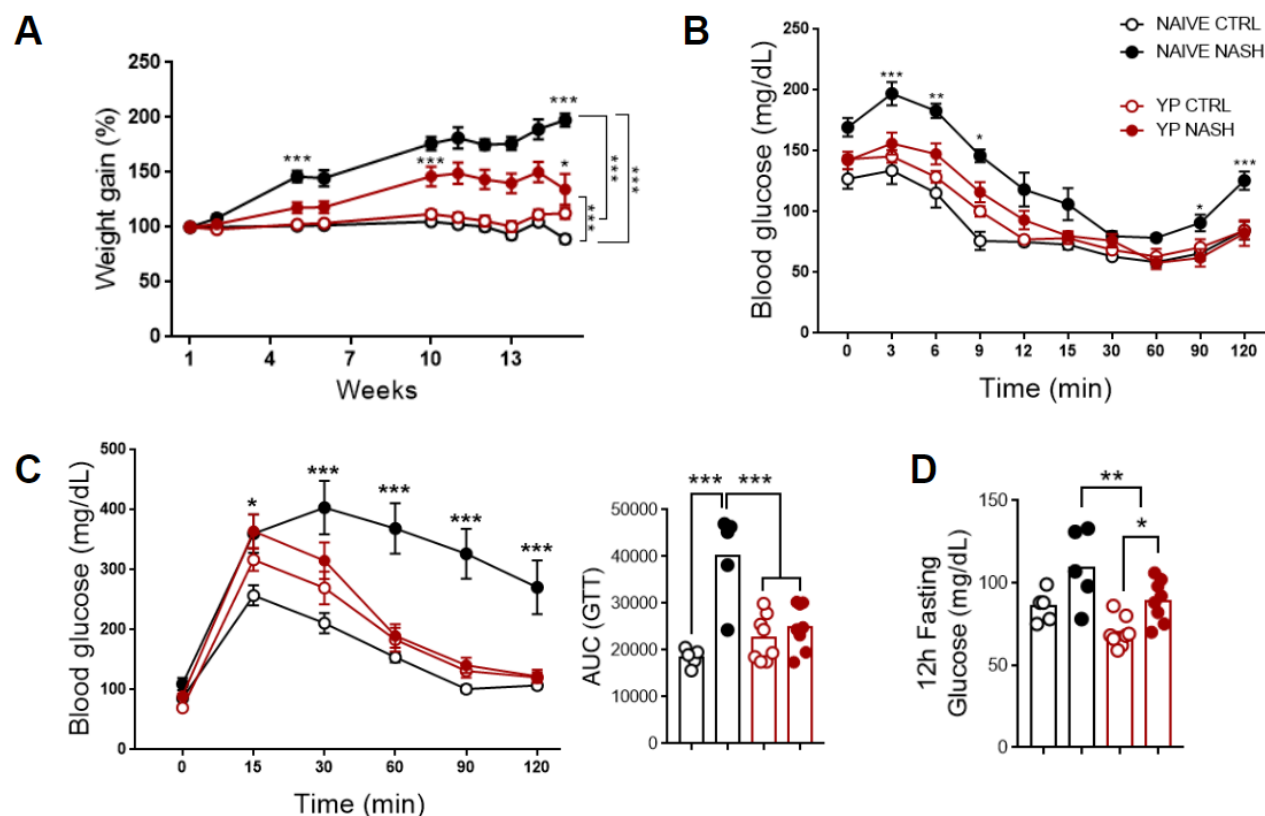


Figura 1: A infecção prévia por YP protege o hospedeiro da SM induzida pela dieta NASH. Camundongos C57BL/6 foram infectados e após 4 semanas, iniciamos a administração da dieta NASH. **A)** Percentagem de ganho de peso corpóreo avaliado nas semanas indicadas no gráfico. **B)** Teste de tolerância à glicose (GTT) realizado na 13ª semana de tratamento com a dieta. **C)** Teste de tolerância a insulina realizado na 14ª semana de tratamento com a dieta. **D)** Glicemia medida após 12h de jejum na 12ª semana de tratamento com a dieta. Resultados representativos de um experimento reproduzido uma vez (n=5-8). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Por conta disto, decidimos analisar o fígado destes animais, por citometria de fluxo. Como o fígado possui um componente imunológico vascular muito importante, utilizamos o método de injeção de anticorpos anti-CD45 i.v., descrito no **Delineamento 2**, para separar os leucócitos presentes no parênquima hepático e na vasculatura. Como os resultados gerados permitiram a identificação de várias populações celulares, utilizamos uma estratégia de redução de dimensionalidade das amostras dos diferentes grupos, chamada t-SNE (**Figura 2A**). Verificamos que os camundongos infectados, após tratamento com a dieta NASH, apresentavam significativamente mais leucócitos CD45⁺ quando comparado com os outros grupos, e que esse aumento era devido a uma infiltração leucocitária no parênquima hepático (**Figura 2B**) em número de células. E

observamos uma inversão, nesses camundongos da proporção de células entre a vasculatura e o parênquima, apesar de o número de leucócitos não se alterar na vasculatura (**Figura 2C**).

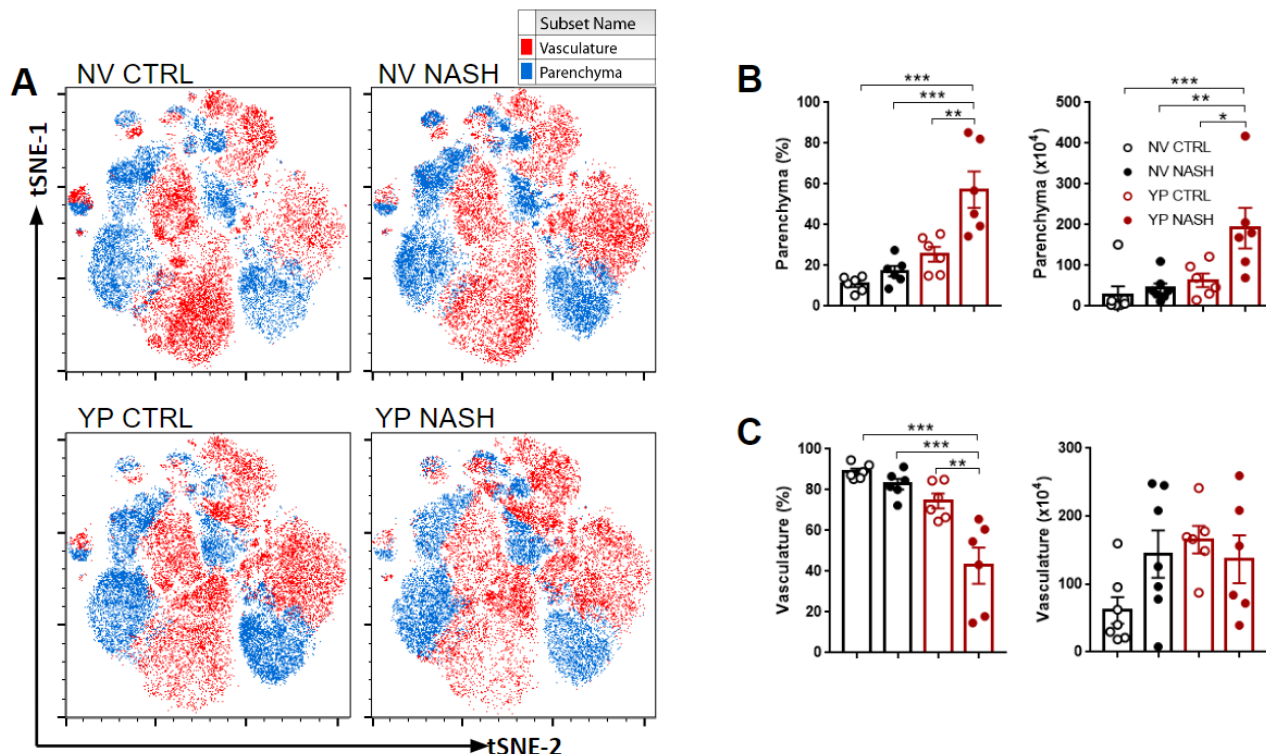


Figura 2: Infecção por YP aumenta a infiltração de leucócitos para o parênquima hepático após consumo de dieta NASH. Camundongos C57BL/6 foram infectados e 4 semanas após a infecção, iniciamos a administração da dieta NASH. Após 15 semanas de dieta, os animais foram eutanasiados e o fígado retirado para análise de citometria de fluxo. **A)** Análise t-SNE dos leucócitos totais CD45⁺ presentes no parênquima (azul) e na vasculatura (vermelho) hepáticos. **B)** Gráficos indicando a proporção e número de células CD45⁺ no parênquima. **C)** Gráficos indicando a proporção e número de células CD45⁺ na vasculatura. Resultados representativos de um experimento reproduzido uma vez (n=5-7-5-6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Verificamos também que a população de linfócitos T representava uma parcela significativa dos leucócitos que infiltravam no parênquima hepático, enquanto sua proporção diminuía na vasculatura (dados não mostrados). Portanto, optamos por analisar mais profundamente essa população de linfócitos, explorando os variados subtipos através da expressão diferencial de fatores de transcrição. Da mesma forma, aplicamos um método de redução de dimensionalidade para observar em conjunto alterações nos subtipos de linfócitos (**Figura 3A**).

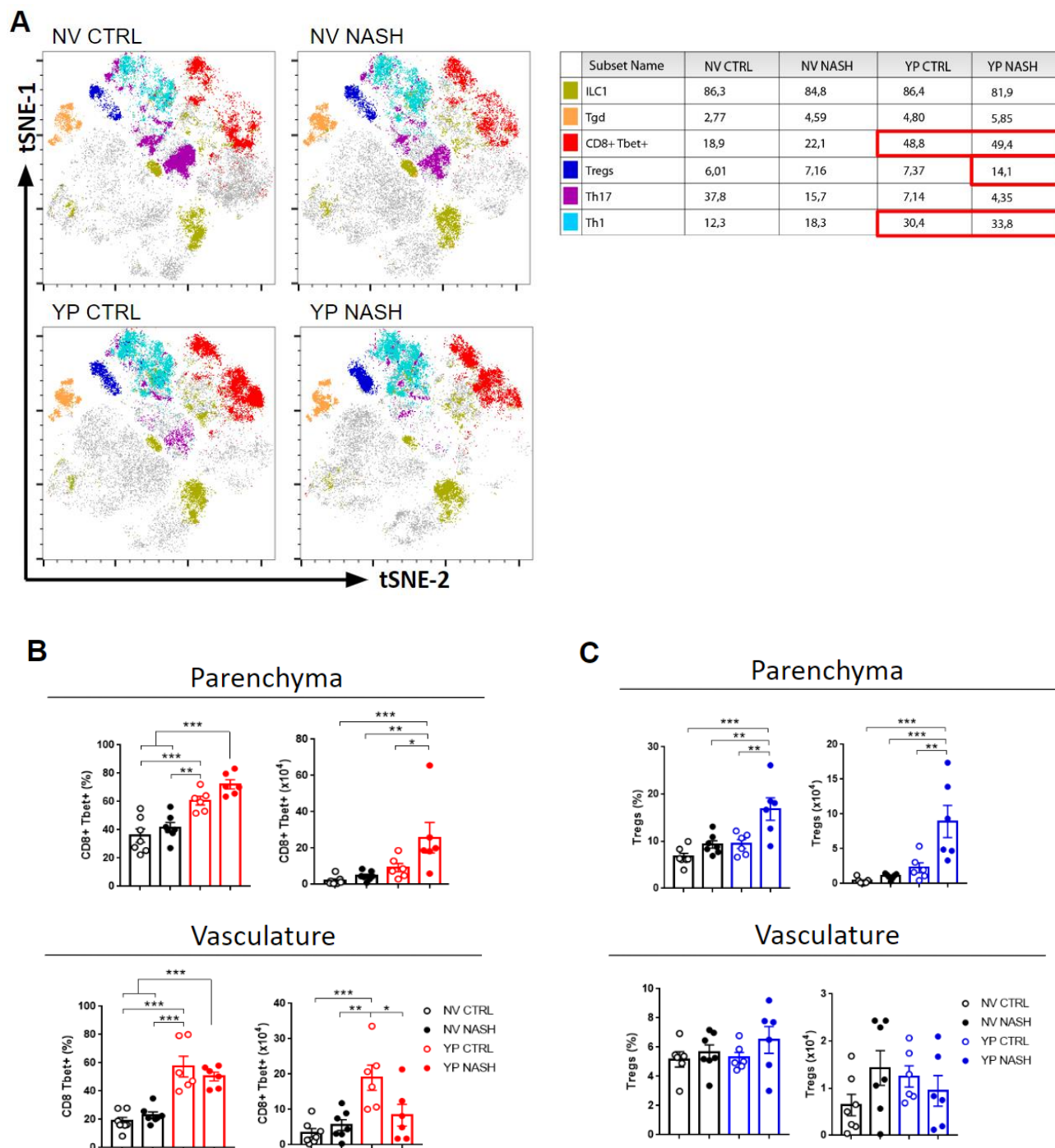


Figura 3: Perfil inflamatório hepático induzido pela infecção por YP é modulado pelo tratamento com a dieta NASH. Camundongos C57BL/6 foram infectados e 4 semanas após a infecção, iniciamos a administração da dieta NASH. Após 15 semanas de dieta, os animais foram eutanasiados e o fígado retirado para análise de citometria de fluxo. **A)** Análise t-SNE dos diferentes subtipos de linfócitos T e ILC1 presentes no fígado. Na tabela, estão indicadas as frequências dos subtipos de linfócitos analisados dentro de cada *gate* específica de acordo com o anexo 2. **B)** Gráficos indicando a proporção e número de linfócitos T CD8⁺Tbet⁺ no parênquima e vasculatura. **C)** Gráficos indicando a proporção e número de Tregs no parênquima e vasculatura. Resultados representativos de um experimento reproduzido uma vez (n=5-7-5-6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Em paralelo, também verificamos um aumento significativo de células TCD8⁺ e TCD4⁺ que expressavam o fator de transcrição Tbet (Tc1), nos camundongos que foram infectados em relação aos *naïves*, independentemente da dieta (**Figura 3A e 3B**). No entanto, observamos também um aumento significativo de linfócitos Treg no parênquima hepático apenas nos camundongos infectados que receberam a dieta NASH (**Figura 3C**). Estes resultados sugerem que, embora a infecção por YP seja suficiente para induzir um acúmulo de linfócitos Th1 e Tc1 no parênquima hepático, o tratamento com a dieta NASH induz também o recrutamento de células Treg o que vai de encontro à nossa hipótese inicial de que a inflamação se exacerbaria com a dieta, mas explicaria em partes a sustentação de um melhor metabolismo pelos animais infectados.

Acreditamos que estas Treg poderiam estar relacionadas com a melhora metabólica vista nos camundongos por contrabalancear a inflamação causada pelas células Th1 e Tc1 e, assim, manter a função homeostática do fígado. Portanto, analisamos a co-expressão de outros fatores de transcrição pelas Tregs, visto que a co-expressão de GATA-3 e ROR γ t por Tregs amplifica e direciona a sua capacidade supressora (WANG *et al.*, 2011 / ZHOU *et al.*, 2008). Embora não tenhamos encontrado expressão de GATA-3 e ROR γ t nas Tregs hepáticas (dados não mostrados) verificamos que na vasculatura hepática de animais infectados houve o aumento significativo da expressão de Tbet nas Tregs comparados ao grupo *naïve* (**Figuras 4A e 4C**). Mas somente nos camundongos infectados que receberam dieta (YP NASH) houve o aumento de linfócitos Treg Tbet⁺ no parênquima hepático (**Figuras 4B e 4D**). Quando analisamos as histologias do fígado, vimos que os camundongos YP/NASH apresentavam uma menor esteatose hepática quando comparados aos camundongos *naïves* tratados com a dieta (**Figura 4E**), indicando um possível papel dos linfócitos Treg Tbet⁺ na proteção contra o acúmulo de gordura e inflamação hepática na progressão de síndrome metabólica. Resultados do nosso grupo mostraram que infecção por YP induz um estímulo inflamatório no parênquima hepático (Oliveira *et al.*, *unpublished*). Por isso, acreditamos ser possível que, semelhantemente às células inflamatórias, as Tregs também poderiam estar expressando o fator de transcrição Tbet, de forma que o mesmo estímulo que atrai as células inflamatórias Tbet⁺ também atrairiam os linfócitos Treg Tbet⁺ no tecido dos camundongos YP/NASH. As etapas futuras deste projeto envolvem estudar este mecanismo.

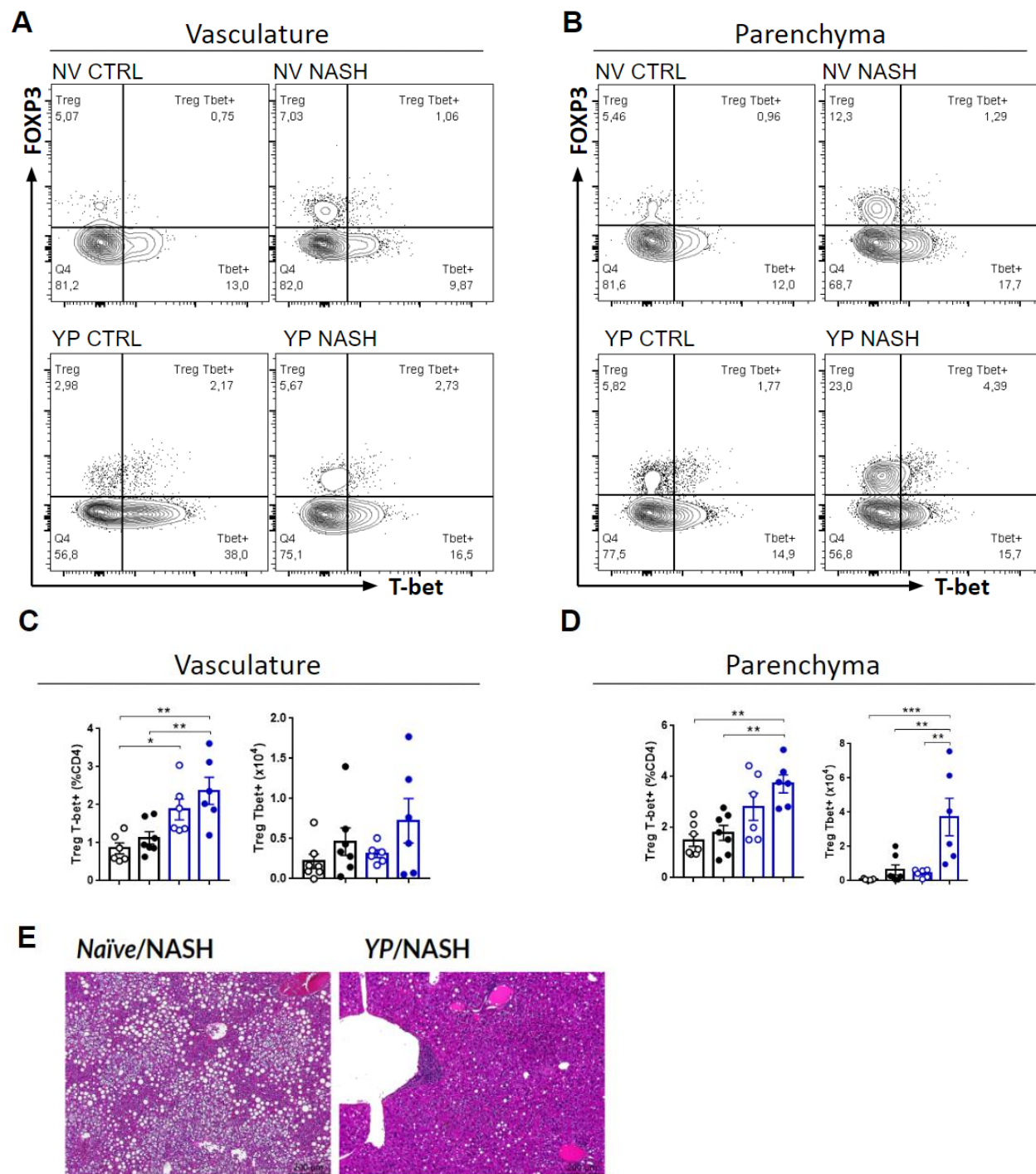
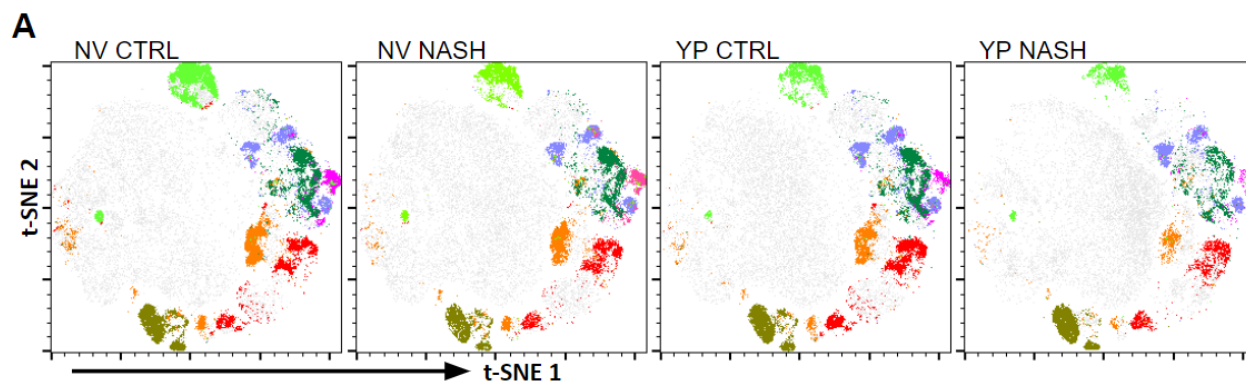


Figura 4: A infecção prévia por YP leva a um acúmulo de Treg Tbet⁺ no parênquima hepático após o tratamento com a dieta NASH. Camundongos C57BL/6 foram infectados e 4 semanas após a infecção, iniciamos a administração da dieta NASH. Após 15 semanas de dieta, os animais foram eutanasiados e o fígado retirado para análise de citometria de fluxo. **A)** *Contour-plots* representativos das Tregs Tbet⁺ (FOXP3⁺Tbet⁺) na vasculatura hepática. **B)** *Contour-plots* representativos das Tregs Tbet⁺ (FOXP3⁺Tbet⁺) no parênquima hepático. **C)** Gráficos indicando a proporção e número de Tregs Tbet⁺ na vasculatura. **D)** Gráficos indicando a proporção e número de Tregs Tbet⁺ no parênquima. Resultados representativos de

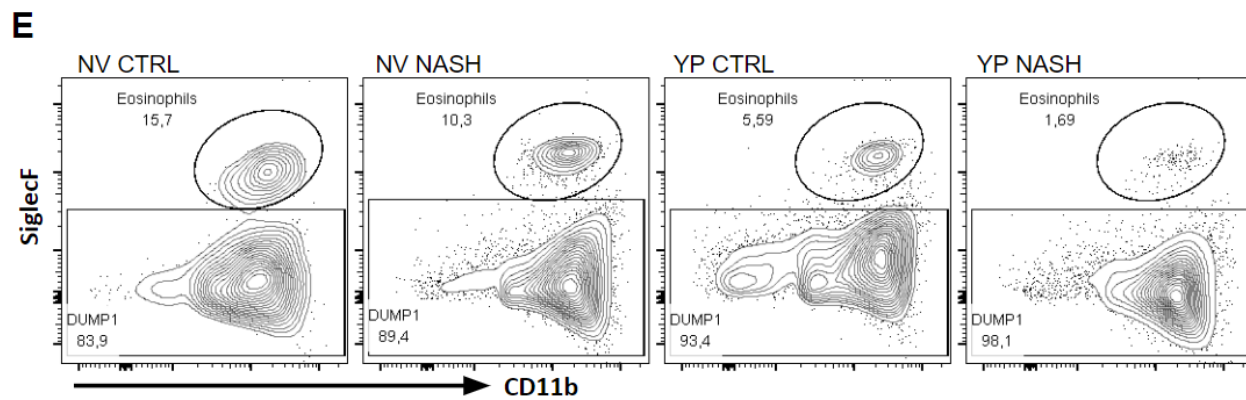
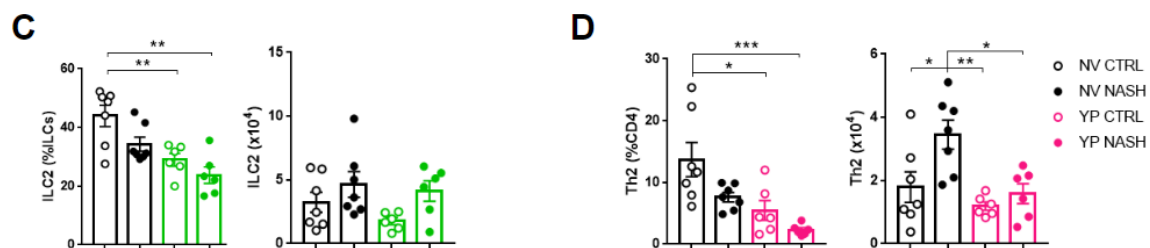
um experimento reproduzido uma vez (n=5-7-5-6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Visto que a resposta inflamatória contra YP e contra a própria microbiota se dá em meio ao mesentério, causando dano nos vasos linfáticos (FONSECA *et al.*, 2015), decidimos analisar por citometria de fluxo esse tecido também, empregando o método t-SNE discutido anteriormente (**Figuras 5A e 5B**). Observamos, principalmente, uma redução significativa na proporção de células da imunidade do tipo 2 nos camundongos infectados após dieta NASH, como nas ILC2 (**Figura 5C**) e Th2 (**Figura 5D**) e uma consequente redução na proporção de eosinófilos nos camundongos YP NASH (**Figura 5E e 5F**). Apesar disso, também vimos uma redução em células da imunidade do tipo 1, como células Th1 (dados não mostrados), mas principalmente de células ILC1 (**Figura 5G**). Realizamos também ELISA para dosagem de citocina Th1 ($IFN\gamma$) em amostras de homogenato de mesentério: observamos uma redução significativa desta citocina nos camundongos infectados após a dieta quando comparados aos camundongos YP na dieta controle (**Figura 5H**). Não houve, no entanto, diferenças significativas na proporção de Tregs e de Tregs Tbet+ neste tecido (dados não mostrados). Células de imunidade do tipo 2, como ILC2, Th2 e eosinófilos são importantes para manter um microambiente menos inflamatório no tecido adiposo. Esses resultados indicam que a quebra na homeostase observada no mesentério de camundongos infectados não é recuperada após a dieta NASH, mesmo com o ganho metabólico apresentado por esses animais.



B

	NV CTRL		NV NASH		YP CTRL		YP NASH	
Subset Name	Freq. of Total	Freq. of Parent	Freq. of Total	Freq. of Parent	Freq. of Total	Freq. of Parent	Freq. of Total	Freq. of Parent
ILC2	0,98	47,2	0,37	31,9	0,28	26,4	0,20	21,3
Th2	0,38	11,6	0,16	5,09	0,073	1,93	0,037	1,29
Tc1	0,35	23,2	0,23	11,4	0,53	22,9	0,19	10,8
Th1	0,50	15,1	0,43	13,3	0,50	13,1	0,20	6,97
ILC1	0,77	37,1	0,44	37,8	0,35	32,7	0,13	14,2
Tregs	0,32	8,77	0,42	11,6	0,45	10,8	0,30	9,59
Ty δ , ROR γ t+	0,69	82,4	0,29	56,7	0,51	69,3	0,67	69,4



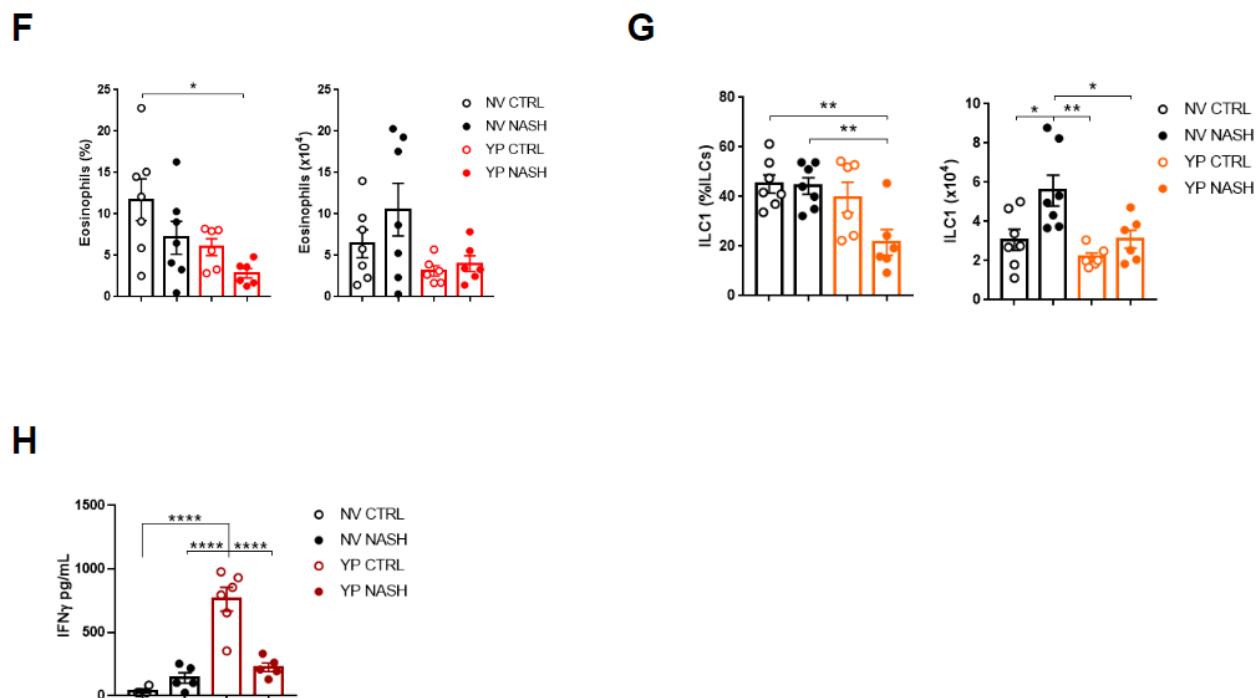


Figura 5. Tecido adiposo mesentérico pós-infecção não recupera a homeostase após dieta NASH. Camundongos C57BL/6 foram infectados e 4 semanas após a infecção, iniciamos a administração da dieta NASH. Após 15 semanas de dieta, os animais foram eutanasiados e o mesentério retirado para análise de citometria de fluxo. **A)** Análise t-SNE dos diferentes subtipos de células linfoides presentes no mesentério. **B)** Na tabela, estão indicadas as frequências dos subtipos de linfócitos analisados dentro de cada *gate* específica de acordo com o anexo 2. **C)** Gráficos indicando a proporção e número de células ILC2. **D)** Gráficos indicando a proporção e número de células Th2. **E)** Contour-plot representativo da população de eosinófilos nos diferentes grupos. **F)** Gráficos indicando proporção e número de eosinófilos. **G)** Gráficos indicando proporção e número de ILC1. **H)** Gráfico de concentração de IFN γ em pg/mL medida por ELISA a partir de amostras de homogenato.

5. DISCUSSÃO

A hipótese inicial do presente projeto era a de que infecções gastrointestinais que causassem processos inflamatórios crônicos no tecido adiposo e no fígado, como é o caso da infecção por YP, poderiam levar a uma maior predisposição à SM durante desafio com dietas ricas em lipídeos e frutose, que supostamente sobrecarregam a função hepática. Ao contrário desta hipótese, nossos resultados mostram que animais previamente infectados por YP possuem um controle no ganho de peso, uma melhora dos parâmetros glicêmicos e maior preservação do fígado em contexto de SM. Acreditamos que essa melhora pode estar relacionada com a proteção do tecido hepático à esteatose

e dano hepatocelular verificada nas análises histológicas. É possível que a preservação do parênquima hepático possa ser atribuída à infiltração de linfócitos Treg. Portanto, a hipótese mais provável é que a proteção observada no fígado desses animais esteja também melhorando a resposta glicêmica e que as Treg Tbet⁺ são essenciais para este processo.

É sabido que as Tregs podem adquirir a expressão de outros fatores de transcrição de acordo com o microambiente em que se encontram. A expressão de GATA3 nas Tregs ocorre naturalmente e é essencial para sua função ao formar complexos proteicos com FOXP3 reforçando sua função supressora (WANG *et al.*, 2011 / RUDRA *et al.*, 2012). A expressão de ROR γ t é essencial nas primeiras etapas de desenvolvimento das Tregs, mas é suprimida nas etapas tardias (ZHOU *et al.*, 2008). Embora alguns trabalhos mostrem que expressão de ROR γ t contribui para o controle da colite experimental em camundongos, dentro de condições inflamatórias mais intensas ela pode contribuir para a inflamação através de produção de citocinas Th17 perdendo assim a função reguladora, inclusive expressando os mesmos receptores de quimiocinas das células Th17 (KOMATSU *et al.*, 2014).

É descrito na literatura que linfócitos Treg Tbet⁺ atinge de 3-5% do total de Tregs nos linfonodos, e a menos de 10% no baço (YU *et al.*, 2015). No entanto a expressão de Tbet pelas Tregs pode ser adquirida em condições de inflamação, especialmente em resposta à interferon- γ (IFN- γ) e ao contrário das células que expressam ROR γ t, existe um controle mais restrito para a diferenciação para células Th1 (KOCH *et al.*, 2009; KOCH *et al.*, 2012). A expressão de Tbet por estas células permite a transcrição de CXCR3, um receptor de quimiocinas tipicamente expresso por células Th1 (KOCH *et al.*, 2009). De forma interessante, Tregs Tbet⁺ são melhor induzidas por IL-27 em sítios de mucosa (HALL *et al.*, 2012) e mesmo que estas células percam a expressão de Tbet, elas continuam expressando o receptor CXCR3 (YU *et al.*, 2015). Esses estudos indicam que a expressão de Tbet em Tregs é induzida em um microambiente pró-inflamatório, e que as Tregs Tbet⁺ conseguem migrar para o sítio de inflamação Th1 onde estão as células efetoras, exercendo lá um papel regulador. O desafio com infecções produz um microambiente fértil para a indução e migração de Tregs Tbet⁺ (KOCH *et al.*, 2009; HALL

et al., 2012). O mesmo pode estar acontecendo durante infecção por YP, em que observamos a ocorrência de linfadenopatia crônica no linfonodo mesentérico (MLN) e inflamação crônica no mesentério do tipo Th1 dependente da microbiota, enquanto as respostas Th17 estão comprometidas (FONSECA *et al.*, 2015). Uma consequência importante dessa inflamação, é o remodelamento dos vasos linfáticos mesentéricos que passam a “vazar” o conteúdo linfático, incluindo os quilomícrons da dieta para a cavidade peritoneal em processo chamado ascite quilosa. Dessa forma, a inflamação crônica decorrente da cicatriz imunológica e da ascite quilosa pode estar induzindo a expressão de Tbet nas Treg do linfonodo mesentérico. Durante o desafio com a dieta NASH, estes linfócitos seriam recrutados para o fígado onde a própria infecção por YP promove um microambiente Th1 que é exacerbada pela dieta.

O consumo de frutose em conjunto com uma dieta hiperlipídica é um grande estímulo inflamatório no fígado. Primeiramente, a frutose quando metabolizada no fígado causa depleção de ATP nos hepatócitos, e com isso, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (JENSEN *et al.*, 2018). Modelos de esteatohepatite não-alcóolica reportam aumento da expressão do inflamassoma NLRP3. Ativação de NLRP3 culmina com a liberação de IL-18 e IL-1 β citocinas altamente inflamatórias, mas também na piroptose do hepatócito em questão (MRIDHA *et al.*, 2017; WREE *et al.*, 2014). Tudo isso propicia um ambiente altamente inflamatório para a migração de linfócitos efetores. A presença de linfócitos TCD8⁺ e células NKT já foi relacionada com dano celular na EHNA (WOLF *et al.*, 2014; DUDEK *et al.*, 2021). Isso nos levou a acreditar primeiramente que animais infectados (onde se observou o aumento dessas células), possuiriam uma piora do quadro de esteatohepatite. O resultado contrário, no entanto, salienta o papel das Tregs recrutadas para o fígado dos animais YP/NASH

No entanto, é possível também que os efeitos hepáticos da infecção não estejam afetando a melhora metabólica observada, e que esse efeito esteja sendo mediado por outros tecidos, como os tecidos adiposos branco e marrom. Um experimento realizado por outro membro do laboratório indicou que há um remodelamento do tecido adiposo branco (Siqueira *et al.*; em submissão) em que camundongos infectados apresentaram hiperplasia do tecido adiposo e *beigeing*. Em situações de obesidade é esperada a hipertrofia dos adipócitos em que há o aumento do tamanho dos adipócitos do tecido

adiposo branco (ZHAO *et al.*, 2021) e branqueamento (*whitening*) do tecido adiposo marrom. Os animais previamente infectados, além da hiperplasia e *beigeing*, também apresentam proteção contra o branqueamento do tecido adiposo marrom (Siqueira *et al.*; em submissão). Estes fenômenos podem estar ligados à melhora observada nos camundongos infectados após dieta NASH, uma vez que o processo de hiperplasia está relacionado a benefícios metabólicos enquanto o processo de hipertrofia se relaciona com obesidade e resistência à insulina (GHABEN & SCHERER, 2019). Nos tecidos de animais infectados com *YP*, nós também notamos o *beigeing* dos adipócitos brancos, isto implica na mudança destes adipócitos para um fenótipo mais metabolicamente ativo e que já foi relacionado com uma melhora na homeostase glicêmica (CHONDRONIKOLA *et al.*, 2014). No entanto, não sabemos se o mesmo acontece nesses camundongos após a dieta NASH, sendo necessário outros experimentos para podermos afirmar isto.

Nessa questão, a microbiota comensal, em especial no intestino, compõe um fator importante para o estado metabólico do hospedeiro. A bactéria *Akkermansia muciniphila* (encontrada em níveis aumentados em camundongos infectados por *YP*, dados não publicados), possui efeitos de melhora no metabolismo glicêmico e que, em última instância, diminui a produção de ácidos graxos livres pelo tecido adiposo (GREER *et al.*, 2017). Além disso, foi observado em humanos que suplementação com *Akkermansia* melhorou a sensibilidade à insulina e reduziu a massa corporal (DEPOMMIER *et al.*, 2019). Paralelamente, a presença de SFB (Bactéria Segmentada Filamentosa) melhora os parâmetros glicêmicos em condições de síndrome metabólica em dieta suplementada com açúcar (KAWANO *et al.*, 2022). Neste mesmo estudo, foi visto que SFB induzia linfócitos Th17 que mantinham a integridade da barreira intestinal. Dessa forma, ainda é necessária a realização de experimentos mecanísticos para definirmos a contribuição da microbiota alterada pela infecção nos resultados obtidos neste projeto.

É possível também que metabólitos microbianos possam afetar de parâmetros metabólicos. A presença de indol, um produto do metabolismo do triptofano pela microbiota, possui efeito de redução da glicemia e melhora da esteatose hepática (MA *et al.*, 2020). A presença de succinato metabolizado pela microbiota também pode melhorar os parâmetros glicêmicos (DE VADDER *et al.*, 2021). A própria bactéria *Akkermansia*

muciniphila já foi reportada regulando o metabolismo de L-aspartato para melhorar parâmetros de EHNA e obesidade em uma dieta de síndrome metabólica (RAO *et al.*, 2021).

Um mecanismo possível para unir as duas hipóteses apresentadas seria a da produção diferencial de ácidos biliares pelos camundongos infectados por YP. Ácidos biliares são capazes de ativar termogênese (WATANABE *et al.*, 2006), possivelmente promovendo o *beigeing/browning* do tecido adiposo branco. Sabemos que a ativação intestinal do receptor de ácidos biliares farnesoide X (FXR) também promove *browning* do tecido adiposo, melhorando a sensibilidade à insulina e a resposta glicêmica (FANG *et al.*, 2015; PATHAK *et al.*, 2018). A ativação de outro receptor de ácidos biliares, TGR5, aumenta a produção de GLP-1 (PATHAK *et al.*, 2018; THOMAS *et al.*, 2009). A produção de GLP-1 e de GIP-1 está aumentada na infecção por YP, sendo induzida por uma bactéria do gênero *Sutterella*, que se encontra aumentada também no intestino de animais infectados (Siqueira *et al.*, *under review*). De forma inversa, ativação do tecido adiposo marrom, induzido por frio, também pode alterar a microbiota intestinal, através da liberação de colesterol e produção de ácidos biliares (WORTHMANN *et al.*, 2017). Tal mecanismo geraria um ciclo autossuficiente em que a infecção por YP inicia uma mudança na microbiota que promove o *browning* to tecido adiposo, conseqüentemente, o *browning* to tecido adiposo promove a manutenção desta microbiota, pela produção de ácidos biliares. Um outro efeito desse ciclo seria o aumento da produção das incretinas. Isto explicaria o por que de camundongos infectados possuem este ganho metabólico à longo prazo, independentemente da presença de YP.

Outro mecanismo que pode contribuir para o fenótipo observado é o *leaking* dos quilomícrons da dieta para a cavidade peritoneal, observado nos camundongos infectados. Isso pode explicar o fato de não haver esteatose no fígado dos animais infectados após a dieta NASH, uma vez que o lipídeo absorvido não consegue chegar pela via linfática clássica até o fígado. É possível então que esse lipídeo esteja tomando uma rota alternativa, que não envolva seu transporte até o fígado, logo protegendo esse órgão do acúmulo lipídico. Pretendemos avaliar também a absorção dos lipídeos da dieta, uma vez que os próprios ácidos biliares estão envolvidos com a emulsificação e metabolismo de lipídeos no lúmen intestinal (MU *et al.*, 2004). É plausível que as

mudanças nos ácidos biliares possam causar alterações na absorção de lipídeos. A ativação de FXR, por exemplo, reduz a absorção lipídica (CLIFFORD *et al.*, 2021) e protege da esteatose hepática.

Existe, portanto, a possibilidade de outros tecidos adiposos estarem participando favoravelmente da proteção metabólica. No entanto, isso não foi observado no mesentério, o tecido adiposo que está na “linha de fogo” durante a infecção por YP. Vimos nesse tecido uma redução de ILC2 nos camundongos YP NASH células que são importantes para a homeostase do tecido adiposo (BRESTOFF *et al.*, 2015 / CARDOSO *et al.*, 2021). De forma semelhante, a perda de células Th2 e suas citocinas produzidas podem desbalancear a homeostase nesse tecido, promovendo resistência à insulina (KANG *et al.*, 2019). A perda destas células provavelmente acarreta na redução de eosinófilos, que também possuem papel no controle de obesidade e homeostase tecidual (ZHANG *et al.*, 2015 / WU *et al.*, 2011). As células da imunidade Th2 são importantes para homeostase do tecido adiposo, pois produzem citocinas que mantêm o microambiente menos inflamatório através da ativação de, por exemplo, macrófagos M2-like, além de manter um fenótipo metabolicamente ativo nos adipócitos (BRESTOFF *et al.* 2015 / ZHANG *et al.*, 2015). Paradoxalmente, a perda de células como ILC1, incluindo células *Natural Killer*, também está relacionada com a promoção de obesidade e resistência à insulina no tecido adiposo (LEE *et al.*, 2016 / O’Sullivan *et al.*, 2016). Alguns estudos indicam que as ILC1 são responsáveis por eliminar células potencialmente inflamatórias, impedindo o estabelecimento da *low-grade inflammation* que é clássica da obesidade (WEISBERG *et al.*, 2003 / BOULENOUAR *et al.*, 2017). Esses dados indicam que o mesentério não recupera sua homeostase pós-infecção por YP, exatamente como hipotetizamos, e provavelmente está em processo de aumento da resistência à insulina e acúmulo lipídico típico da obesidade ao perder as células que mantêm sua homeostase. Mas apesar disso, outros efeitos metabólicos sistêmicos podem estar sendo capazes de contrabalancear a inflamação no tecido adiposo mesentérico, mantendo assim a proteção observada nos animais YP NASH.

Em resumo, este trabalho mostra que apesar de já sabermos que camundongos infectados por YP possuem uma melhora no metabolismo em condições de dieta controle, o resultado obtido com os animais YP NASH foi surpreendente no sentido de

ficarem protegidos da obesidade, do T2D e EHNA induzidos pela dieta, mesmo após 15 semanas. Camundongos previamente infectados, portanto, adquirem resistência à síndrome metabólica induzida pela dieta. Ainda não temos certeza de qual a causa dessa resistência mostrada pelos camundongos infectados após dieta NASH. Sabemos que em contexto de dieta controle a microbiota exerce um grande papel, através da produção de incretinas. No entanto, acreditamos que para que os camundongos YPNASH mantenham essa proteção, o fígado destes animais também deve ser protegido. E por conta disso, as Tregs infiltrantes no parênquima hepático são centrais para manter esse balanço. Acreditamos que para a chegada dessas Tregs no parênquima hepático a expressão do fator de transcrição Tbet é importante, uma vez que o estímulo inflamatório atrai os linfócitos que expressam esse fator. É possível, então, que linfócitos Treg, durante o contexto da infecção, em que há inflamação no linfonodo mesentérico, adquiram o fator de transcrição Tbet e passem a expressar receptores de quimiocinas semelhantes aos das células efectoras inflamatórias, como CXCR3. Quando há o estímulo inflamatório, causado pela dieta NASH, no fígado essas células provavelmente migram para o fígado, partindo de locais de indução como o MLN e o mesentério. É possível que a proteção seja também mediada por outros tecidos, por exemplo através da comunicação do tecido adiposo com o fígado e conseqüentemente com a microbiota, através da produção de ácidos biliares.

6. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que camundongos previamente infectados são protegidos de SM induzida por dieta NASH. Animais, após se recuperarem da infecção, e serem submetidos à dieta NASH, os animais são capazes de reduzir a esteatose hepática, o ganho de peso e a resistência à insulina causados pela dieta NASH. Tal proteção gira possivelmente ao redor do fígado e no aumento de Treg Tbet+, mas também pode estar ocorrendo por outros mecanismos sistêmicos.

Apesar disso, o tecido adiposo mesentérico apresenta uma quebra na homeostase induzida pela infecção por YP e que não é recuperada após tratamento com a dieta NASH,

indicando que este tecido não contribui para a melhora do metabolismo observada nos animais YP NASH.

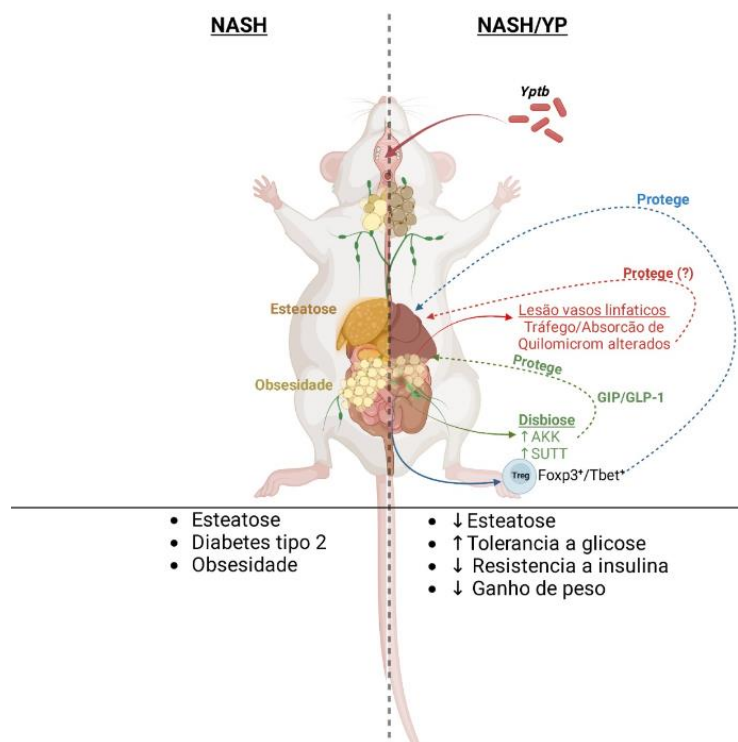


Figura 6. Resumo dos resultados atingidos.

7. REFERÊNCIAS

- BALASUBRAMANIAN, R *et al.* The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal Salmonella infections. **Hum Vaccin Immunother.**; v. 15(6); p.1421-1426. 2019.
- BLÜHER, M Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nat Rev Endocrinol.** v. 15(5): p. 288-298. 2019.
- BOULENOUAR, S *et al.* Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. **Immunity.**; v. 46(2), p. 273-286, 2017.
- BRESTOFF, C *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. **Nature.** v. 519(7542); p. 242-246. 2015.
- CAO, E *et al.* Mesenteric lymphatic dysfunction promotes insulinresistance and represents a potential treatment target in obesity. **Nat Metab.** v.3(9): p. 1175-1188. 2021.
- CARDOSO, F *et al.* Neuro-mesenchymal units control ILC2 and obesity via a brain-adipose circuit. **Nature.** v. 597(7876); p. 410-414. 2021

CHO, NH *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 138; p. 271-281. 2018.

CHONDRONIKOLA, M *et al.* Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. **Diabetes.** v. 63(12); p. 4089-4099. 2014.

CLIFFORD, BL *et al.* FXR activation protects against NAFLD via bile-acid-dependent reductions in lipid absorption. **Cell Metab.** v.33(8), p. 1671-1684.e4, 2021.

CZEPIELEWSKI, RS *et al.* Ileitis-associated tertiary lymphoid organs arise at lymphatic valves and impede mesenteric lymph flow in response to tumor necrosis factor. **Immunity;** v.54(12), p. 2795-2811.e9, 2021.

DE VADDER, F *et al.* Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. **Cell Metab;** v. 24(1); p.151-157, 2016.

DEPOMMIER, C *et al.* Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. **Nat Med.;** v.25(7), p.1096-1103, 2019.

DUDEK, M *et al.* Auto-aggressive CXCR6⁺ CD8 T cells cause liver immune pathology in NASH [published correction appears in Nature. 2021 May;593(7860):E14]. **Nature.;** v. 592(7854); p.444-449, 2021.

EESTERHÁZY, D *et al.* Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. **Nature.;** v. 569(7754); p. 126-130, 2019.

FANG, S *et al.* Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. **Nat Med.;** v. 21(2), p. 159-165, 2015.

FONSECA, DM *et al.* Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. **Cell.;** v. 163(2); p. 354-366, 2015.

Ghaben, AL & Scherer, PE. Adipogenesis and metabolic health. **Nat Rev Mol Cell Biol.;** v. 20(4); p. 242- 258, 2019.

HA, CWY *et al.* Translocation of Viable Gut Microbiota to Mesenteric Adipose Drives Formation of Creeping Fat in Humans. **Cell.;** v.183(3), p. 666-683.e17, 2020.

HALL, AO *et al.* The cytokines interleukin 27 and interferon- γ promote distinct Treg cell

populations required to limit infection-induced pathology. **Immunity**; v. 37(3), p. 511-523, 2012.

HAND, TW *et al.* Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. **Science**; v. 337(6101), p. 1553-1556. 2012.

JENSEN, T *et al.* Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol.**; v. 68(5), p. 1063-1075, 2018.

KANG, YE *et al.* Regulation of Systemic Glucose Homeostasis by T Helper Type 2 Cytokines. **Diabetes Metab J**; v.43(5), p. 549-559, 2019.

KAWANO, Y *et al.* Microbiota imbalance induced by dietary sugar disrupts immune-mediated protection from metabolic syndrome. **Cell**; v.185(19); p. 3501-3519.e20, 2022.

KHALIL, I *et al.* Capturing the true burden of Shigella and ETEC: The way forward. **Vaccine**; v.37(34), p. 4784-4786, 2019.

KOCH, MA *et al.* The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. **Nat Immunol.**; v. 10(6), p. 595-602, 2009.

KOCH, MA *et al.* T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor β 2. **Immunity**; v. 37(3), p. 501-510, 2012.

KOMATSU, N *et al.* Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. **Nat Med.**; v. 20(1)p. 62-68, 2014.

LEE, BC *et al.* Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. **Cell Metab.**; v. 23(4), p. 685-698, 2016.

MA, L *et al.* Indole Alleviates Diet-Induced Hepatic Steatosis and Inflammation in a Manner Involving Myeloid Cell 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3. **Hepatology**; v. 72(4), p. 1191-1203, 2020.

MATHARU, KS *et al.* Toll-like receptor 4-mediated regulation of spontaneous Helicobacter-dependent colitis in IL-10-deficient mice. **Gastroenterology**; v. 137(4), p. 1380-90.e903, 2009.

MRIDHA, AR *et al.* NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. **J Hepatol.**; v. 66(5), p. 1037-1046, 2017.

MU, H *et al.* The digestion of dietary triacylglycerols. ***Prog Lipid Res.***; v. 43(2), p. 105-133, 2004.

NOUBIAP, JJ *et al.* Global, regional, and country estimates of metabolic syndrome burden in children and adolescents in 2020: a systematic review and modelling analysis. ***Lancet Child Adolesc Health.***; v. S2352-4642(21)00374-6, 2022.

OSBORN, O & OLEFSKY, JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. ***Nat Med.***; v. 18(3), p. 363-374, 2012.

O'SULLIVAN, TE *et al.* Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. ***Immunity.***; v. 45(2), p. 428-441, 2016.

PATHAK, P *et al.* Intestine farnesoid X receptor agonist and the gut microbiota activate G-protein bile acid receptor-1 signaling to improve metabolism. ***Hepatology.***; v. 68(4) p. 1574-1588, 2018.

PEYRIN-BIROULET, L *et al.* Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. ***Gut.***; v. 61(1), p. 78-85, 2012.

RUDRA, D *et al.* Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. ***Nat Immunol.***; v. 13(10), p. 1010-1019, 2012.

SHEKA, AC *et al.* Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. ***JAMA.***; v. 323(12), p. 1175-1183, 2020.

THOMAS, C *et al.* TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. ***Cell Metab.***; v. 10(3), p. 167-177, 2009.

WANG, Y *et al.* An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. ***Immunity.***; v. 35(3), p. 337-348, 2011.

WATANABE, M *et al.* Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. ***Nature.***; v. 439(7075), p. 484-489, 2006.

WEISBERG, SP *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. ***J Clin Invest.***; v. 112(12), p. 1796-1808, 2003.

WOLF, MJ *et al.* Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. ***Cancer Cell.***; v. 26(4), p. 549-564, 2014.

WORTHMANN, A *et al.* Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. **Nat Med.**; v. 23(7), p. 839-849, 2017.

WREE, A *et al.* NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. **J Mol Med (Berl)**.; v. 92(10), p. 1069-1082, 2014.

WU, D *et al.* Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**.; v. 332(6026), p. 243-247, 2011.

YU, F *et al.* Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance. **Nat Immunol.**; v. 16(2), p. 197-206, 2015.

ZHANG, Y *et al.* Eosinophils Reduce Chronic Inflammation in Adipose Tissue by Secreting Th2 Cytokines and Promoting M2 Macrophages Polarization. **Int J Endocrinol.**; v. 2015, p. 565-760, 2015.

ZHAO, GN *et al.* TMBIM1 is an inhibitor of adipogenesis and its depletion promotes adipocyte hyperplasia and improves obesity-related metabolic disease. **Cell Metab.**; v. 33(8), p. 1640-1654.e8, 2021.

ZHOU, L *et al.* TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. **Nature**.; v. 453(7192), p. 236-240, 2008.

8. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação geral do Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Cicatriz Imunológica pós-infecção intestinal aguda e desenvolvimento de distúrbios metabólicos: estudo das interações entre a microbiota e sistema imunológico do mesentério*", registrado sob o protocolo nº **49/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **14/06/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Denise Moraes da Fonseca**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Ricardo Wesley Alberca Custódio (Pós-graduando), Mamtchilo Russo (Pesquisador colaborador), Niels Olsen Saraiva Câmara (Pesquisador colaborador), Fernanda Peixoto Barbosa Nunes (Pesquisador colaborador), Eliane Aparecida Gomes de Mello Nascimento (Especialista em laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Impact of infection-induced immunological scarring on the long-term host metabolic homeostasis*", protocol nº **49/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **6/14/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Denise Moraes da Fonseca**

- Team members: *Ricardo Wesley Alberca Custódio (Graduate Student), Mamtchilo Russo (Collaborator Researcher), Niels Olsen Saraiva Câmara (Collaborator Researcher), Fernanda Peixoto Barbosa Nunes (Collaborator Researcher), Eliane Aparecida Gomes de Mello Nascimento (Laboratory Technician)*

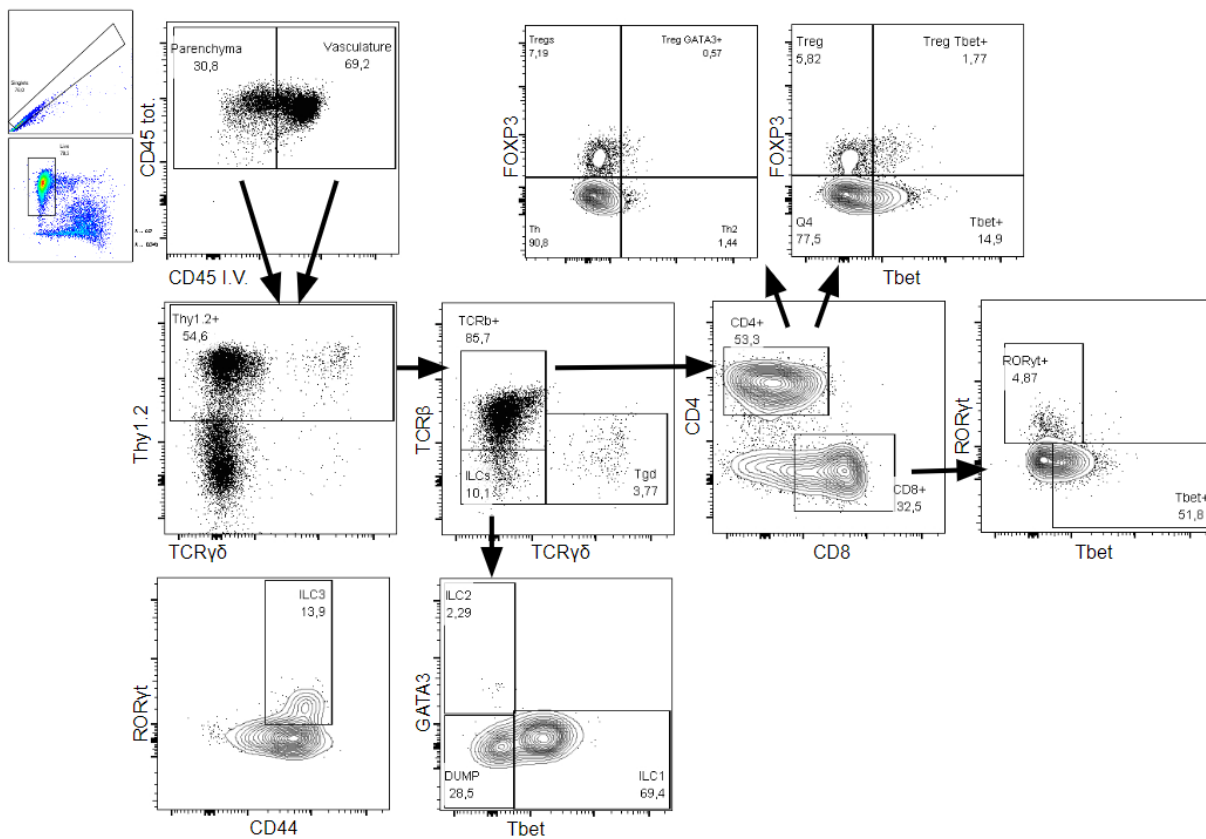
At the end of the period granted by this license, the Principal investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	CS7BL/6	Fêmea/female	4-6 Semanas/weeks	1538

São Paulo, 16 de junho de 2016.


Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP


Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-secretário CEUA-ICB/USP



BernardoOliveira

19/10/22 Bernardo de Castro Oliveira

19/10/22 Profa. Denise Morais da Fonseca