

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Ciências Biomédicas

LETÍCIA GAMA E SILVA CALIXTO

**Efeito de episódio de infecção gastrointestinal aguda sobre a patogênese e
progressão do diabetes mellitus tipo 1**

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Ciências Biomédicas

LETÍCIA GAMA E SILVA CALIXTO

**Efeito de episódio de infecção gastrointestinal aguda sobre a patogênese e
progressão do diabetes mellitus tipo 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Denise Morais da Fonseca

Versão original.

SÃO PAULO

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica Instituto de Ciências
Biomédicas

Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo (a) autor (a)

Efeito de episódio de infecção gastrointestinal aguda sobre a patogênese e progressão do diabetes mellitus tipo 1 / Nome do autor: Leticia Gama e Silva Calixto; Nome do orientador: Denise Moraes da Fonseca - - São Paulo, 2023.

Nº de páginas (68)

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.,

1. Diabetes tipo 1 2. Infecção Gastrointestinal 3. Microbiota Intestinal 4. Metabolismo. I. Fonseca, Denise Moraes da II. Efeito de episódio de infecção gastrointestinal aguda sobre a patogênese e progressão do diabetes mellitus tipo 1.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Letícia Gama e Silva Calixto

Título da Dissertação: Efeito de episódio de infecção gastrointestinal aguda sobre a patogênese e progressão do diabetes mellitus tipo 1.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Moraes da Fonseca

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Qualificação da Dissertação, em sessão pública realizada a __/__/__, considerou a candidata:

() **Aprovada**

() **Reprovada**

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito de episódio de infecção gastrointestinal aguda sobre a patogênese e progressão do diabetes mellitus do tipo 1", protocolada sob o CEUA nº 8571030321, sob a responsabilidade de **Denise Moraes da Fonseca e equipe; Letícia Gama E Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de camundongos pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 13/05/2021.

We certify that the proposal "Effect of an episode of acute gastrointestinal infection on pathogenesis and progression of type 1 diabetes mellitus", utilizing 356 Isogenics mice (356 females), 198 Spontaneous mutant mice (198 females), protocol number CEUA 8571030321, under the responsibility of **Denise Moraes da Fonseca and team; Letícia Gama E Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/13/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 24 meses Depto/Setor: Imunologia

Origem: Biotério Central FMUSP

Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Fêmeas Idade ou peso: 4 a 8 semanas Linhagem: C57BL/6

N amostral: 356 Origem: Biotério do Departamento de Imunologia

Espécie: Camundongo mutante espontâneo sexo: Fêmeas Idade ou peso: 6 a 8 semanas Linhagem:

NOD (NOD/ShiLtJ) Non-obese diabetic **N amostral:** 138 Origem: Biotério do Departamento de Imunologia

Espécie: Camundongo mutante espontâneo sexo: Fêmeas Idade ou peso: 6 a 8 semanas Linhagem:

NOR (NOR/LtJ) non obese resistant **N amostral:** 60

São Paulo, 04 de junho de 2021





Profa. Dra. Luciane Valéria Sita Dr. Alexandre Ceroni

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III / Cidade Universitária, Butantã - CEP 05508-000 - São Paulo/SP - tel: 55 (11) 3091-7733 Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 16h : e-mail: cep@icb.usp.br

CEUA N 8571030321

Dedico este trabalho ao meu filho, Miguel.

*"You are my sunshine, my only sunshine
You make me happy when skies are gray"*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar à **Deus**, a quem pertence toda honra e toda a glória e a **Jesus Cristo**, Amigo Fiel e Verdadeiro, que me abriram esta porta em direção ao meu sonho, não me desampararem durante todo esse árduo percurso e me deram condições de alcançar esta vitória.

Agradeço à minha família, minha base, fonte de todo o meu amor e inspiração.

Aos meus pais, **Alessandra e Márcio**, que me criaram em um ambiente de muito amor e incentivo à cultura e à educação, me dando toda a liberdade para escolher e condições para perseguir meus sonhos, sempre me apoiando nas minhas decisões. Graças a vocês, hoje eu tenho asas para voar, com a segurança de sempre ter para onde retornar. À minha irmã, **Gabriela**, que durante um certo período foi minha companhia e excelente co-pilota nas idas e vindas entre Campinas-São Paulo e ao meu irmão, **Victor**, que genuinamente se interessa pelo que eu faço e sempre me escuta com o maior entusiasmo. Eu amo vocês!

Ao meu marido e amor da minha vida, **Nicholas**, que ao longo de 8 anos de parceria, passou comigo pelas fases mais importantes da minha vida, desde a saída do ensino médio à pós-graduação, sempre apoiando -ainda que muitas vezes sem compreender- minhas escolhas profissionais, me incentivando e me dando condições de me dedicar à carreira de pesquisadora em um país que tão pouco nos valoriza.

À minha querida amiga e alma-gêmea, **Thalyta**, que me escuta, sofre e se alegra na mesma proporção junto comigo, me motiva e sempre acredita em mim, mesmo quando eu mesma já não acredito. Todas as minhas vitórias são um pouco suas também.

Mais uma vez à minha mãe e meu marido, que juntamente com a minha sogra **Luciane** e meu sogro **Eneias**, me deram todo o suporte necessário para dar seguimento ao mestrado após o retorno da licença-maternidade. Sair para trabalhar e deixar em casa um bebê de 6 meses foi, sem dúvida alguma, a decisão mais difícil e dolorida de toda a minha vida, mas deixar o Miguel aos cuidados de vocês deixava

meu coração tranquilo, com a segurança de que, depois de mim, ninguém no mundo poderia amar mais ou cuidar melhor do meu filho do que vocês.

À todos os meus colegas do Laboratório de Imunologia de Mucosas, **Marina Caçador Ayupe, Caio Loureiro Salgado, Franciele Moreira, Gabriele Manamy Rodrigues, Guilherme William da Silva, Bernardo de Castro Oliveira**, por toda ajuda nos planejamentos e execução das tarefas de laboratório e experimentos e por todo o apoio ao longo destes dois anos, em especial, ao **Leonardo Mandu**, que trabalhou lado a lado comigo na execução deste projeto.

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Denise Moraes da Fonseca**, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e pelos valiosos ensinamentos, que contribuíram para o meu amadurecimento não somente profissional mas também pessoal.

Ao professor **Pedro Manoel**, do Laboratório de Imunometabolismo, da UNICAMP e à sua aluna de pós-doutorado **Bianca Castelucci**, e ao professor **Silvio Roberto Consonni**, e à técnica de laboratório **Cintia Rizoli Ruiz**, que me acompanharam e auxiliaram em todas as etapas do processamento das amostras para análise histológica.

Por último, mas de maneira nenhuma menos importante, agradeço ao meu filho **Miguel**, que veio como um raio de sol no momento de maior escuridão no mundo, em meio a uma pandemia, mostrando que a vida sempre há de permanecer sobre toda a adversidade; que esteve comigo durante todo esse processo, desde a barriga e que, embora sem qualquer pretensão ou necessidade, serve de motivação para que eu corra atrás de todos os meus sonhos e objetivos e busque ser uma pessoa melhor todos os dias. Meu amor por você é incondicional. Obrigada por me permitir viver essa dádiva!

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação da Prof. Dr.^a Denise Morais da Fonseca, no Laboratório de Imunologia de Mucosas – LabIM, no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 2020/16648-3, 2015/25364-0 e 2021/06881-5).

“Porque Dele, por Ele, e para Ele, são todas as coisas; Glória pois à Ele, eternamente. Amém”

Romanos 11:36.

RESUMO

GAMA E SILVA, L. Efeito de episódio de infecção gastrointestinal aguda sobre a patogênese e progressão do diabetes mellitus tipo 1. 2023. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O trato gastrointestinal abriga uma ampla variedade de microorganismos comensais que participam ativamente de diversos processos fisiológicos e imunológicos do hospedeiro, incluindo a modulação do metabolismo. Além da microbiota, a mucosa intestinal está constantemente exposta a diversos antígenos ambientais provenientes da dieta, microbiota e patógenos, de maneira que é necessário um sistema imunológico altamente especializado, que permita ao hospedeiro tolerar os antígenos inócuos, mas também elaborar respostas contra potenciais patógenos. Este equilíbrio entre sistema imunológico e o ambiente, que sustenta também a composição da microbiota, é essencial para a manutenção da homeostase no tecido intestinal e perturbações neste equilíbrio são comumente observadas em pacientes com doenças autoimunes, como por exemplo o diabetes mellitus do tipo 1 (DM1). Assim, o objetivo deste projeto foi investigar o impacto de um episódio de infecção aguda por *Yersinia pseudotuberculosis* no desenvolvimento do DM1, com a hipótese de que o mesmo impactaria de forma negativa sob a patogênese e progressão da doença. Para isso, foi utilizado modelo animal de DM1 induzido por múltiplas doses de estreptozotocina (*MLD-STZ*) e camundongos *non-obese-diabetic* (NOD), que desenvolvem diabetes espontaneamente. No modelo *MLD-STZ* a infecção não apresentou nenhum impacto significativo sobre a patogênese e progressão do DM1. Entretanto, no modelo NOD, os camundongos previamente infectados apresentaram uma menor incidência de DM1, escore de insulite reduzido nas ilhotas pancreáticas e melhoras no controle metabólico. Além disso, somente o transplante de microbiota fecal de camundongos C57BL/6 previamente infectados para camundongos NOD foi capaz de reproduzir estes efeitos protetores observados, indicando que alterações na microbiota causadas pela infecção estão envolvidas na proteção contra o DM1.

Palavras-chave: Diabetes tipo 1, Infecção gastrointestinal, Microbiota intestinal, Metabolismo.

ABSTRACT

GAMA E SILVA, L. Effect of an episode of acute gastrointestinal infection on the pathogenesis and progression of type 1 diabetes mellitus. 2023. Dissertation (Master in Immunology). Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

The gastrointestinal tract harbors a wide variety of commensal microorganisms that actively participate in several physiological and immunological processes of the host, including the modulation of the metabolism. In addition to the microbiota, the intestinal mucosa is constantly exposed to several environmental antigens deriving from the diet, commensal microorganisms and pathogens, so a highly specialized immune system is needed, which allows the host to tolerate innocuous antigens, but also to elaborate responses against potential pathogens. This balance between the immune system and the environment, which also supports the composition of the microbiota, is essential for maintaining homeostasis in the intestinal tissue, and disturbances in this balance are commonly observed in patients with autoimmune diseases, such as type 1 diabetes mellitus (T1D). Thus, the objective of this project was to investigate the impact of an episode of acute infection by *Yersinia pseudotuberculosis* on the development of DM1, with the hypothesis that it would negatively impact the pathogenesis and progression of the disease. For this, an animal model of T1D induced by multiple low-doses of streptozotocin (MLD-STZ) and non-obese-diabetic (NOD) mice, which spontaneously develop diabetes, were used. In the MLD-STZ model, the infection did not have any significant impact on the pathogenesis and progression of DM1. However, in the NOD model, previously infected mice had a lower incidence of DM1, reduced pancreatic insulinitis score, and improvements in metabolic control. Furthermore, only the transplantation of fecal microbiota from previously infected C57BL/6 mice to NOD mice was able to reproduce these observed protective effects, indicating that alterations in the microbiota caused by the infection are involved in protection against DM1.

Keywords: Type 1 Diabetes, Gastrointestinal infection, Gut microbiota, Metabolism.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

BSA – Albumina total bovina

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais local

CFU - Unidades Formadoras de Colônia (Do inglês *Colony Forming Unit*)

DM1 - Diabetes Mellitus Tipo 1

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

gLN - Linfonodos drenantes do intestino (Do inglês, *gut draining lymphonodes*)

FMT - Transplante de microbiota fecal (Do inglês, *Fecal Microbiota Transplant*)

GTT – Teste de tolerância à glicose

GF- *germ free*

HLA - Antígeno Leucocitário Humano (Do inglês, *Human Leucocyte Antigen*)

HE – Hematoxilina e Eosina

I.P. – Intraperitoneal

ITT – Teste de tolerância à insulina

LPS - lipopolissacarídeo

MAIT - Células T invariantes associadas à mucosa (do inglês *Mucosal Associated Invariant T Cells*)

MLD-STZ - *Multiple Low Doses - STZ*

MHC - Complexo Maior de Histocompatibilidade (Do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)

NV - *Naïve*

NOD - *Non-obese-diabetic*

NOR - *Non-obese-resistant*

NLR - (Do inglês, *NOD Like Receptors*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PRR - Receptor de reconhecimento de padrões (Do inglês, *Pattern recognition receptor*)

pLN - Linfonos pancreáticos (Do inglês, *pancreatic lymphonodes*)

RPMI – meio “*Roswell Park Memorial Institute*”

SCFA - Ácidos graxos de cadeia curta (Do inglês, *Short Chain Fatty Acids*)

SFB – Soro fetal bovino

SFB - Bactéria Segmentada Filamentosa (Do inglês, *Segmented Filamentous Bacteria*)

SPF - Livres de patógenos específicos (Do inglês, *Specific Pathogens Free*)

STZ - Estreptozotocina (Do inglês, *Streptozotocin*)

TEDDY - *The Environmental Determinants of Diabetes in the Young*

TLR - (Do inglês, *Toll Like Receptors*)

TUDCA - Ácido tauroursodesoxicólico

YP - *Yersinia pseudotuberculosis*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. A mucosa gastrointestinal como local de alta exposição a antígenos.....	16
1.2 Infecção por <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> e a cicatriz imunológica.....	20
1.3 Diabetes Mellitus tipo 1.....	22
1.3.1 Eixo intestino-pâncreas.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. MÉTODOS.....	29
3.1 Camundongos.....	29
3.2. Infecção gastrointestinal por <i>Y. pseudotuberculosis</i>	29
3.3. Indução do diabetes tipo 1 por <i>MLD-STZ</i>	30
3.4. Avaliação de DM1 em camundongos NOD/NOR.....	30
3.5. Teste de tolerância à glicose (GTT).....	31
3.6. Teste de tolerância à insulina (ITT).....	31
3.7. Histologia.....	31
3.8. Processamento e coleta de células do pâncreas.....	32
3.9. Citometria de fluxo.....	32
3.10. Ensaio de detecção de anticorpos ligados à microbiota por citometria de fluxo.....	33
3.11. Análise de translocação de microbiota intestinal.....	33
3.12 ELISA.....	34
3.13. Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Caracterização da infecção por <i>Y. Pseudotuberculosis</i>	35
4.2. Padronização do protocolo de indução de DM1 por <i>MLD-STZ</i>	38
4.3 Avaliação do efeito de infecção prévia por <i>Y. pseudotuberculosis</i> no desenvolvimento do DM1 induzido por <i>MLD-STZ</i>	42
4.4. Caracterização do modelo de diabetes autoimune em camundongos NOD.....	47
4.5. Avaliação de efeito da infecção por <i>Y. pseudotuberculosis</i> em	

camundongos NOD.....	56
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. A mucosa gastrointestinal como local de alta exposição a antígenos

A mucosa gastrointestinal abriga aproximadamente 40 trilhões de microorganismos comensais, a chamada microbiota intestinal, que influencia diretamente a saúde do hospedeiro modulando o sistema imunológico e o metabolismo por meio da geração de uma grande variedade de metabólitos bioativos e expressão de aproximadamente 700.000 genes (Kayama *et al.*, 2020). Ao mesmo tempo em que abriga a microbiota comensal, devido a sua grande área de superfície e constante contato com antígenos ambientais, a mucosa gastrointestinal abriga sozinha, mais linfócitos efetores do que todos os órgãos linfóides combinados (Faria *et al.*, 2017). Desta maneira, a manutenção da homeostase desse microambiente requer a existência de um sistema imunológico altamente especializado, que permita ao hospedeiro estabelecer uma relação de mutualismo com a microbiota residente ao mesmo tempo que reconhece e induz imunidade contra potenciais patógenos (Hooper *et al.* 2012; Hand *et al.* 2016). Situações que interfiram neste balanço são críticas e podem atuar como um gatilho para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como por exemplo o diabetes tipo 1 (DM1) (Yuan *et al.* 2022).

Para que a microbiota e o sistema imunológico coexistam no mesmo espaço em harmonia é necessária a existência de uma barreira entre ambos, delimitando o espaço a ser ocupado por cada um. Para tanto, as células epiteliais intestinais respondem a componentes bacterianos, como lipopolissacarídeo (LPS) e flagelina - por meio de vias de sinalização ativadas pelos receptores TLR (do inglês, *Toll Like Receptors*) e NLR (do inglês, *NOD Like Receptors*) - promovendo proliferação celular, reforçando as junções intra-epiteliais e induzindo a produção e secreção de muco e peptídeos antimicrobianos (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Elinav *et al.*, 2011). O muco é produzido por células epiteliais caliciformes especializadas na secreção de glicoproteínas mucinas, sendo a principal delas a MUC2. O muco se organiza em

duas camadas principais: uma camada interna, com a característica de um gel compacto não colonizado por bactérias; e uma camada externa, menos densa, com um volume maior e onde as bactérias podem colonizar (Johansson *et al.*, 2011). A secreção de muco é finamente regulada por mecanismos imunológicos, e estudos mostram que ela pode ser mediada por um eixo NLRP6/IL-18, já que camundongos deficientes de componentes do inflamassoma NLRP6 (do inglês, *NOD-like receptor family pyrin domain*) apresentam prejuízo na secreção de muco, disfunção de células caliciformes (Wlodarska *et al.*, 2014), além de prejuízo na secreção IL-18 (Elinav *et al.*, 2011).

Em paralelo à produção do muco, todos os subtipos de células epiteliais intestinais são capazes de produzir peptídeos antimicrobianos, alguns expressos de maneira constitutiva, como α -defensinas (Hooper and Macpherson, 2010). Além disso, metabólitos produzidos pela própria microbiota estimulam a produção de citocinas que atuam nas células epiteliais reforçando a função de barreira. Um exemplo disto é a ativação do receptor de hidrocarboneto aril (AhR, do inglês *Aryl hydrocarbon receptor*) por fatores derivados da microbiota, que leva a produção de IL-22 por células Th17 e células linfóides inatas do tipo 3 (ILC3, do inglês *innate lymphoid cells*) (Kiss *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2012; Veldhoen *et al.*, 2008; Zelante *et al.*, 2013). Desta forma, a camada de muco, junto com uma secreção local de IgA e peptídeo antimicrobiano, além da barreira epitelial reforçada, mantém uma seletiva compartimentalização da microbiota intestinal, criando um espaço que alguns autores nomearam como “zona desmilitarizada”, que impede que respostas imunológicas sejam montadas contra a microbiota (Vaishnava *et al.*, 2011; Kayama *et al.*, 2020).

Entretanto, apesar destes esforços em manter a compartimentalização, metabólitos bacterianos atingem a circulação e podem ser encontrados em diversos órgãos, podendo inclusive desempenhar papéis na hematopoiese, ativação e educação do sistema imunológico. Desta forma, fica evidente que o sistema imunológico não apenas tolera esses antígenos “*non-self*” da microbiota, como também participa da manutenção da mesma, através de mecanismos de tolerância e imunidade de barreira, mediados principalmente por células T reguladoras (Treg) e células Th17. (Maslowski *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2011; Balmer *et al.*, 2014; Clarke *et al.*, 2010).

Em uma condição de homeostase, a maior parte das células Th1 e Th17 podem ser encontradas no trato gastrointestinal (Belkaid and Harrison, 2017).

Camundongos tratados com antibióticos de amplo espectro apresentam frequências reduzidas de células Th17 e camundongos livres de germes (GF, do inglês *germ-free*) necessitam da colonização pela microbiota para desenvolver uma resposta funcional de células Th17 e Treg no intestino, mostrando que a microbiota desempenha uma importante função na modulação e maturação do sistema imunológico (Atarashi *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2008; Ivanov *et al.*, 2008; Naik *et al.*, 2012; Herold *et al.*, 2013; Belkaid and Hand, 2014). Neste contexto, alterações na composição da microbiota podem levar à disbiose, ou seja, diminuição na diversidade bacteriana e crescimento exacerbado de algumas espécies em detrimento de outras, promovendo um ambiente pró-inflamatório no intestino, que pode levar a um aumento na permeabilidade intestinal e translocação de metabólitos bacterianos para órgãos adjacentes, como o pâncreas, fígado e compartimentos de tecido adiposo (Mokhtari *et al.*, 2021).

As bactérias da microbiota também desempenham um papel importante no aproveitamento de componentes da dieta que não podem ser digeridos pelo hospedeiro, como fibras, sendo um dos principais metabólitos resultantes deste processo de fermentação os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA, do inglês *Short Chain Fatty Acids*) (Cummings *et al.*, 1987). Os níveis de SCFA estão diretamente relacionados com a composição da microbiota e baixos níveis são observados em pacientes DM1. Além disso, SCFA aparentam ter um papel protetor no camundongo NOD (*Non-obese-diabetic*), um dos principais modelos animais para o estudo do DM1, relacionado ao aumento na frequência de Treg e diminuição na frequência de células T-autorreativas (Sun *et al.*, 2015). Camundongos NOD alimentados com dietas que levam ao aumento de butirato e acetato no cólon apresentaram diferentes níveis de proteção contra o DM1, e a administração combinada de acetato e butirato foi eficaz para proteger os camundongos do desenvolvimento do DM1. Neste contexto, foi observado que o acetato está relacionado à diminuição da frequência de células T autorreativas e o butirato aumentou o número e melhorou a função de células Treg (Mariño *et al.*, 2017).

Algumas bactérias da microbiota são consideradas “*keystone species*”, ou seja, espécies cuja presença ou ausência tem um impacto significativo na estrutura e função de um ecossistema (Paine, 1966). A bactéria filamentosa segmentada (SFB, do inglês, *Segmented Filamentous Bacteria*) é um exemplo de *keystone specie*: Trata-se de uma bactéria gram-positiva, que coloniza o íleo terminal de camundongos e tem um efeito dominante no sistema imunológico da mucosa, promovendo o

acúmulo de células e Th17 e a produção local de IgA (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2009; Talham *et al.*, 1999; Umesaki *et al.*, 1999). Ao contrário da maioria das bactérias que reside fora da “zona desmilitarizada”, SFB interage diretamente com o tecido através da adesão à placa de Peyer e células epiteliais, promovendo até mesmo alterações no citoesqueleto destas células (Ivanov *et al.*, 2008; Sczesnak *et al.*, 2011). Esta interação íntima parece estar relacionada à indução de respostas que reforçam a imunidade de barreira, uma vez que o hospedeiro desenvolve uma potente resposta Th17 contra SFB, que está relacionada com a habilidade de promover proteção contra patógenos gastrointestinais (Atarashi *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2009). Além disso, a colonização por SFB também promove a produção de IL-22 por ILC3 de maneira dependente de IL-23 (Atarashi *et al.*, 2015; Sano *et al.*, 2015).

Desta forma, o equilíbrio entre sistema imunológico e microbiota garante a homeostase no tecido intestinal e perturbações, como por exemplo infecções do trato gastrointestinal, podem interferir neste balanço e levar à quebra da homeostase intestinal, promovendo imunidade contra componentes próprios ou da microbiota e podendo atuar como gatilho para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e, de interesse para o presente trabalho, doenças autoimunes (Kaser *et al.*, 2010; Hand *et al.*, 2012; Korpe and Petri, 2012; Korpe *et al.*, 2012; Mondal *et al.*, 2012). Os mecanismos pelos quais infecções gastrointestinais podem interferir na homeostase neste tecido são vários, dentre eles: indução de disbiose e proliferação exacerbada/oportunística de enterobactérias, indução de imunidade contra microrganismos comensais e indução de alterações morfológicas e estruturais da mucosa intestinal e dos tecidos linfóides associados. Além disso, as alterações no trato gastrointestinal causadas por infecções agudas podem persistir por anos, mesmo após a eliminação do patógeno. Tais alterações são caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria, calcificação, alterações na organização da estrutura dos linfonodos drenantes e aumento da permeabilidade intestinal (Heimesaat *et al.*, 2006; Lupp *et al.*, 2007; Craven *et al.*, 2012; Hand *et al.*, 2012; Belkaid *et al.*, 2013; Molloy *et al.*, 2013). Dessa forma, emerge a necessidade de utilização de modelos experimentais que mimetizam infecções gastrointestinais de maneira a melhor compreender os mecanismos de interação entre hospedeiro e patógeno, assim como a modulação da resposta imunológica neste contexto. Algumas bactérias utilizadas para este fim são: Enterobactérias como *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Yersinia*

enterocolítica e *Yersinia pseudotuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* (Jiminez *et al.*, 2015).

1.2. Infecção por *Y. pseudotuberculosis* e a cicatriz imunológica

Y. pseudotuberculosis (YP) é uma bactéria gram-negativa do gênero *Yersinia*, que compreende um grupo de bactérias em forma de bastonete amplamente distribuídas no meio ambiente. Este gênero abrange 17 espécies diferentes, das quais 3 organismos são virulentos para humanos, sendo estes *Yersinia pestis* - conhecida por causar a doença da Peste Bubônica - *Yersinia enterocolítica* e *Yersinia pseudotuberculosis*. Ambos *Y. enterocolítica* e YP são conhecidos por causar uma doença entérica (Brady *et al.*, 2020). A prevalência de YP é maior no hemisfério norte sendo particularmente comum na Finlândia (Fukushima *et al.*, 2001; Jalava *et al.*, 2004). A bactéria ocorre na água e no meio ambiente e foi encontrada em vários animais domesticados, como bois e porcos (Fukushima *et al.*, 1988; Nikolova *et al.*, 2001; Niskanen *et al.*, 2002). No Brasil, foram encontrados registros de contaminação por *Yersinia spp.* em gado e água de várias fontes e esgoto (Falcão *et al.*, 2004).

Neste projeto, utilizamos YP como modelo experimental murino de infecção intestinal que mimetiza as principais características da infecção em pacientes. A infecção se dá pela via oral e a bactéria atravessa o intestino através das células M nas placas de Peyer, tendo predileção pelo íleo, apêndice, linfonodos mesentéricos e fígado (Andrew *et al.*, 1976; Tauxe 2004; Zipp *et al.*, 2006). Camundongos infectados pela via oral com YP desenvolvem uma resposta inflamatória intensa no intestino, baço e linfonodo mesentérico, caracterizada pela ativação de linfócitos específicos tanto para a bactéria, quanto para antígenos da microbiota comensal. Apesar da eliminação da bactéria ocorrer em cerca de duas semanas após a infecção, a resposta inflamatória persiste por meses e leva ao remodelamento do mesentério, que inclui a presença de linfadenopatia mesentérica crônica caracterizada pelo aumento da permeabilidade dos vasos linfáticos e inflamação crônica no tecido adiposo mesentérico. Tais alterações persistem por mais de um ano após o controle da infecção, sugerindo que seriam lesões permanentes. As consequências deste remodelamento são: prejuízos na indução de respostas imunes intestinais canônicas,

devido a restrição do acesso de células dendríticas do subtipo CD103+CD11b+ do intestino para os linfonodos mesentéricos, que ficam retidas no tecido adiposo mesentérico devido ao aumento da permeabilidade dos vasos linfáticos intestinais após a resolução da infecção, promovendo o extravasamento de produtos da microbiota intestinal, que se acumulam no tecido mesentérico adiposo sustentando uma inflamação crônica (Fonseca *et al.*, 2015). Este fenômeno foi nomeado por nosso grupo de “cicatriz imunológica” e apresenta uma nítida relação com a microbiota, uma vez que camundongos GF não apresentam tais defeitos. Além disso, este fenótipo pode ser revertido após a eliminação da microbiota por antibióticos de amplo espectro, ou pelo tratamento com anticorpos contra TNF e IL-1b, sugerindo que esses possam ser os principais mediadores responsáveis pelo fenótipo observado.

Stacy *et al.*, 2020 mostraram que alterações no metabolismo de ácidos biliares causadas pela infecção por *YP* tornam camundongos mais resistentes à infecção por *Klebsiella pneumoniae* (Kpn), uma bactéria gram-negativa que pode colonizar o trato intestinal de seres humanos e camundongos, bem como outros tecidos e órgãos. Além disso, o transplante da microbiota de camundongos previamente infectados com *YP* para camundongos GF foi suficiente para conferir maior resistência para Kpn, mostrando que um episódio único de infecção é suficiente para remodelar a microbiota de forma a aumentar a resistência contra colonização por patógenos. Neste sentido, Lim, *et al.*, 2021 mostraram que fêmeas grávidas infectadas com *YP* apresentam alterações duradouras nas células-tronco epiteliais intestinais e aumento significativo de IL-6 no soro, resultando em ativação e resistência aumentada à infecção intestinal. Quando adultos, os filhotes destas fêmeas apresentam maior número de células Th17 e maior resistência a infecções gastrointestinais, mas também maior reatividade destas células à microbiota e maior suscetibilidade para doenças inflamatórias intestinais, mostrando que o efeito de infecções gastrointestinais no sistema imunológico intestinal e na microbiota é persistente e duradouro e pode ser passado através das gerações.

Uma vez que mesmo um episódio de infecção leve e transiente animal deixa não somente o animal mas também sua prole mais suscetível a doenças inflamatórias, torna-se relevante investigar o impacto desta infecção no desenvolvimento de doenças autoimunes. Neste contexto, resultados não publicados produzidos por nosso grupo indicam a presença de um infiltrado inflamatório no

pâncreas de camundongos C57BL/6 após a infecção por *YP*, caracterizado pela presença de células TCD4+ e TCD8+ produtoras de IFN- γ (Oliveira, B. C. *dados não publicados*). Apesar disso, estes camundongos não desenvolvem DM1 espontaneamente e nem apresentam prejuízo no metabolismo de glicose. Na verdade, De Siqueira *et al.*, 2023 mostraram camundongos C57BL/6 previamente infectados com *YP* apresentam melhora importante no metabolismo de carboidratos, respondendo melhor a testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, e que tais alterações são dependentes de alterações na microbiota causadas pela infecção, em específico, o enriquecimento do gênero *Sutterella*. Esta microbiota alterada pela infecção conferiu aos animais proteção contra desnutrição. Entretanto, não foi avaliado o efeito de um episódio de infecção gastrointestinal aguda por *YP* sob a patogênese e progressão do DM1.

1.3. Diabetes Mellitus tipo 1

O DM1 é uma doença autoimune multifatorial, com mais de 60 genes associados ao seu desenvolvimento (Robertson *et al.*, 2018), caracterizada pela ativação de células T autorreativas e presença de auto-anticorpos contra antígenos pancreáticos, que causam a destruição de células β pancreáticas produtoras de insulina. Genes do HLA contribuem com 40-50% do risco para o desenvolvimento do DM1, estando os genes de HLA classe II relacionados ao início do processo autoimune por meio da ativação de células TCD4+ enquanto os HLA classe I com a progressão da doença através da ativação de células TCD8+ (Pociot *et al.*, 2010). A infiltração de células imunológicas ocorre antes do diabetes evidente (Atikson *et al.*, 2014) e os mecanismos efetores de destruição de células β incluem a ação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , liberação de espécies reativas de oxigênio, ação de granzima e perforina e indução de apoptose através da via Fas/Fas-L (Rabinocitch and Suarez-Pinon, 1998; Mathis *et al.*, 2001). Esta destruição leva a uma perda progressiva da capacidade de produção de insulina e, eventualmente, um estado de deficiência absoluta deste hormônio. Os primeiros eventos relacionados com o início da doença são o aumento da expressão de genes do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) de classe I e de IFN- α pelas células β , entretanto, o gatilho que leva ao

aumento da expressão destes fatores ainda não está completamente elucidado (Houeiss *et al.*, 2022).

O DM1 compreende 90% dos casos de diabetes da infância e 5% a 10% daqueles de início na idade adulta, uma vez que 40% dos pacientes são diagnosticados até os 20 anos de idade (Jahromi and Eisenbarth, 2007). Apesar de predominante na raça branca, sua incidência é variável entre populações e áreas geográficas, refletindo diferentes genes de suscetibilidade e fatores ambientais desencadeantes. As maiores taxas de incidência mundial (superiores a 35/100.000/ano) ocorrem na Finlândia e na Sardenha (Itália), seguidas por populações caucasianas na Europa e na América do Norte, de incidência moderada (cerca de 10-20/100.000/ano). Países asiáticos e a grande maioria dos países da América do Sul apresentam as menores taxas mundiais (inferiores a 5/100.000/ano). No Brasil, a incidência é de 8 casos por 100.000 por ano (Norris *et al.*, 2020).

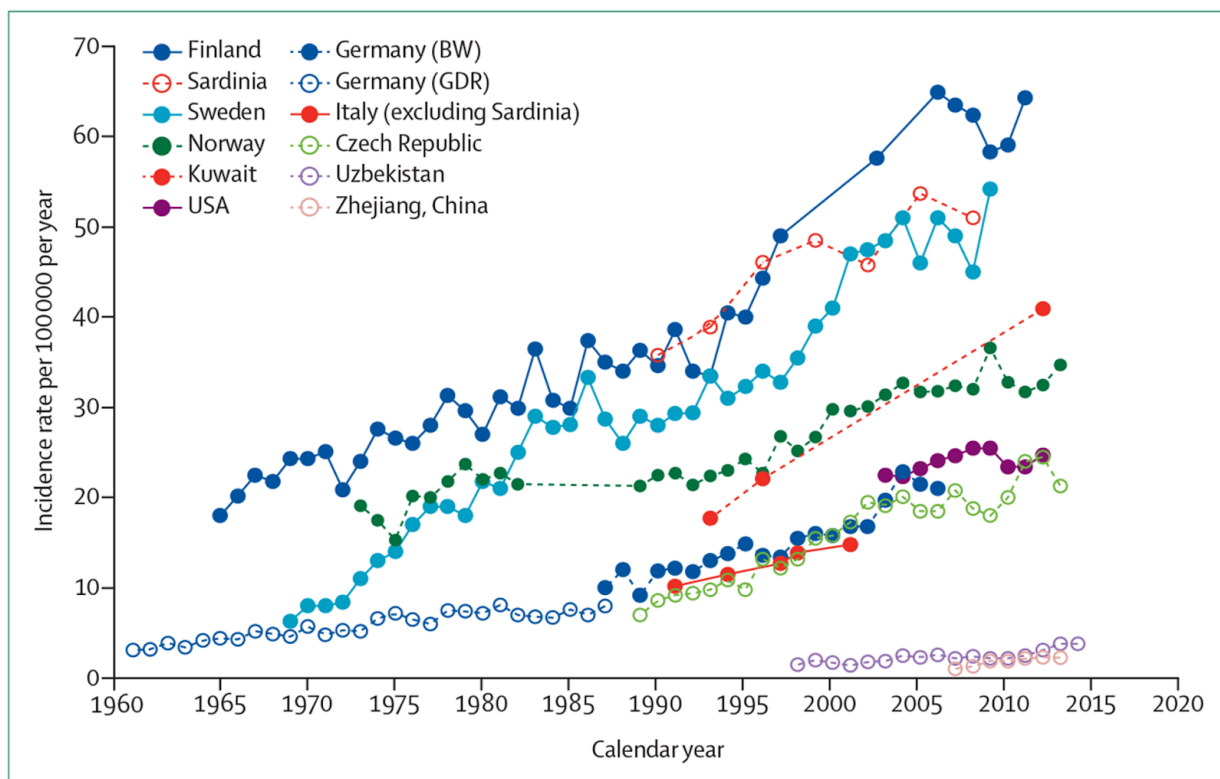


Figura 1. Aumento da incidência mundial de DM1 nos últimos 60 anos. (Norris *et al.*, 2020)

Apesar de ser uma doença poligênica, com mais de 60 loci relacionados ao risco da doença em humanos - sendo aqueles que codificam para HLA os mais importantes para suscetibilidade - diversos fatores ambientais influenciam no seu

desenvolvimento, entre eles: dieta, exposição a agentes infecciosos, infecções gastrointestinais e alterações na composição da microbiota (Ehehalt *et al.*, 2012). O fato de cerca de 30% da população geral apresentar algum grau de predisposição genética, mas apenas 0,5% desenvolver DM1, somado ao fato de diversos estudos mostrarem uma falta de concordância no desenvolvimento da doença mesmo entre gêmeos homozigóticos (Barnett *et al.*, 1981; Redondo *et al.*, 2001; Hyttinen *et al.*, 2003), é um indicativo da importância de fatores ambientais no desenvolvimento da doença (Jahromi *et al.*, 2007; Karvonen *et al.*, 2000; Pihoker *et al.*, 2005; Kantarova and Buc, 2007; Alizadeh and Koeleman, 2008).

Diversas teorias buscam elucidar o papel do ambiente no desenvolvimento do DM1. Dentre elas destacam-se a hipótese da higiene, segundo a qual a melhora nas condições de higiene e a consequente redução na frequência de infecções contribui diretamente para o aumento da frequência de doenças autoimunes e alérgicas; a hipótese do estresse da célula β , segundo a qual resistência a insulina seguido a um rápido crescimento e/ou ganho de peso causa um estresse de retículo na célula β que poderia levar a autoimunidade; a hipótese do “campo fértil”, onde destaca-se o papel de infecções prévias na geração de resposta à auto-antígenos e a “*old friends hypothesis*”, onde a falta de exposição a uma microbiota saudável, que desempenha um papel crucial na ativação, regulação e maturação do sistema imunológico, seria um fator decisivo para o desenvolvimento da autoimunidade (Bach, 2012; Bach, 2018; Ludvigsson, 2006; Rook, 2015; Atkinson, 2012). Com tantas variáveis a serem consideradas, os modelos animais tornam-se uma excelente ferramenta para avaliar o impacto de fatores ambientais para o desenvolvimento do DM1.

O principal modelo para o estudo do DM1 é o camundongo NOD (do inglês, *non-obese diabetic*), que desenvolve diabetes de maneira espontânea com aproximadamente 6-8 semanas de idade. A presença de células da imunidade inata, como células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*), macrófagos e neutrófilos pode ser observada desde as 3 semanas de idade no pâncreas de camundongos NOD e leva à subsequente infiltração de células TCD4 e TCD8, com aproximadamente 4 a 6 semanas de idade. Além disso, assim como ocorre na patologia humana, as células B também estão envolvidas no desenvolvimento do DM1 nestes animais (Miyazaki *et al.*, 1985; Jansen *et al.*, 1994; Diana *et al.*, 2013.)

Embora o camundongo NOD seja amplamente utilizado para estudar o DM1, o mesmo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas ao traduzir seus

resultados para estudos clínicos. Em comparação com ilhotas humanas, por exemplo, camundongos NOD exibem insulite muito mais forte o que, de acordo com Van Belle *et al.*, 2011, é como olhar para duas doenças diferentes. Essas diferenças podem ajudar a explicar por que alguns tratamentos de sucesso no camundongo NOD falharam para mostrar a mesma eficácia quando usados em humanos (Gitleman *et al.*, 2013; Moran *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2015).

Neste sentido, uma alternativa de modelo animal para o estudo do DM1 é o induzido por estreptozotocina (STZ). Trata-se de um composto químico capaz de ser internalizado pelas células B através do receptor GLUT-2, que causa estresse oxidativo e degradação do DNA, culminando na morte das mesmas (Ley *et al.*, 2015). Quando empregado em regime de múltiplas doses baixas, no entanto, a liberação gradual de auto-antígenos pancreáticos resultante da morte destas células leva a um reconhecimento dos mesmos pelo sistema imunológico, resultando na presença de auto-anticorpos contra a célula B e células T auto-reativas (Elias *et al.*, 1994).

1.3.1 Impacto da microbiota intestinal sob a patogênese do DM1

Diversos estudos mostram que o desenvolvimento de diabetes em camundongos NOD depende da composição da microbiota intestinal: camundongos NOD germ-free ou que tiveram a microbiota depletada por antibióticos de amplo espectro desenvolvem DM1 mais cedo, a ativação intestinal de TLR4 e MyD88 e transplante da microbiota de camundongos NOD é capaz de induzir insulite em camundongos NOR (*Non-obese-resistant*) (Brugman *et al.*, 2006; Candon *et al.*, 2015; Livanos *et al.*, 2016; Driver *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2016). O *cross-fostering* -ou seja, transmissão materna da microbiota para filhotes de outra mãe- de filhotes recém-nascidos de camundongos NOD para mãe NOR é capaz de proteger do desenvolvimento do DM1 devido a alterações na composição da microbiota (Daft *et al.*, 2015). Além disso, a incidência da doença e tempo que camundongos NOD demoram para desenvolver DM1 variam de acordo com as condições sanitárias nas quais os camundongos são abrigados: quando as condições sanitárias são ruins, a frequência da doença diminui e a descontaminação dos camundongos por nascimento via cesariana mostrou-se eficaz para restaurar a alta incidência em uma colônia (Bach 2002).

TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) é um estudo longitudinal de longo prazo, iniciado em 2004, que busca elucidar as causas e identificar fatores ambientais que contribuam para o desenvolvimento do DM1 em crianças geneticamente suscetíveis em diferentes países (Finlândia, Alemanha, Suécia, Colorado, Gales, Eslovênia e Tchecoslováquia). Análises metagenômicas e de RNA16s de fezes das crianças mostraram uma maior expansão de espécies de estreptococos em detrimento de *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium dentium* em indivíduos que apresentam a presença de autoanticorpos (Rewers *et al.*, 2018). Desta forma, uso de probióticos, como Bifidobacteria, Lactobacilli, Lactococci e Streptococci, vem sendo estudados como possíveis ferramentas terapêuticas para o DM1 (He *et al.*, 2017). Desta forma, levando em consideração o impacto de alterações na microbiota e no sistema imunológico intestinal para o desenvolvimento do DM1, surge a proposição de um eixo intestino-pâncreas integrando estas respostas.

1.3.1 Eixo intestino-pâncreas

O pâncreas, apesar de não fazer parte do trato gastrointestinal, tem uma relação direta com o intestino devido à sua localização adjacente ao duodeno e seu íntimo contato com o baço e estômago, sendo responsável pela liberação de enzimas responsáveis pela quebra de gorduras, proteínas e carboidratos, além da produção e liberação de insulina pelas células β pancreáticas (Turley *et al.*, 2005). Em contrapartida, o intestino é responsável pela produção e secreção de incretinas, hormônios intestinais que regulam funções endócrinas no pâncreas, como a secreção de insulina. Os hormônios GIP e GLP-1 (do inglês, *Gastric inhibitory polypeptide* e *glucagon-like peptide-1*, respectivamente) são secretados pelas células L e K em resposta a estímulos de nutrientes, glicose e metabólitos da microbiota (como por exemplo sulfeto de hidrogênio) e atuam diretamente nas células β pancreáticas através de receptores específicos (GIPR, do inglês *GIP receptor* e GLP-1R, do inglês *GLP-1 receptor*) estimulando a secreção de insulina de maneira dependente de glicose (Seino *et al.*, 2010). Além destes efeitos insulíntrópicos, GIP e GLP-1

também apresentam efeitos protetores, inibindo a apoptose e estimulando a proliferação das células β (Seino *et al.*, 2010; Pichette *et al.*, 2017).

De Siqueira *et al.*, 2023 mostraram que mudanças na microbiota causadas pela infecção por YP, em específico um aumento na população de bactérias do gênero *Suterella*, foi capaz de aumentar a secreção de GIP, promovendo uma melhora no metabolismo de glicose de animais previamente infectados. Neste contexto, Yoon *et al.*, 2021 demonstraram que a proteína P6, secretada pela bactéria *Akkermansia muninciphila*, foi capaz de aumentar os níveis de GLP-1, melhorando a tolerância à glicose em camundongos C57BL/6 tratados com dieta rica em lipídeos. Estes achados evidenciam a importância da microbiota para o diálogo entre intestino e pâncreas.

Os linfonodos drenantes do intestino (gLNs, do inglês *gut draining lymphonodes*) também desempenham um importante papel na interação entre intestino e pâncreas, especialmente em situações de perturbação na homeostase intestinal (Randolph *et al.*, 2017; Cording *et al.*, 2014). Esterhazy *et al.*, 2019 mostraram que os gLNs são imunologicamente segregados e induzem respostas específicas de acordo com o segmento funcional do intestino que drenam. Os linfonodos pancreáticos (pLN, do inglês *pancreatic lymphonodes*) também estão associados ao trato gastrointestinal e são responsáveis pela drenagem tanto do pâncreas quanto do duodeno. Além disso, antígenos pancreáticos e intestinais compartilham a mesma localização anatômica no pLN (Van den Broeck *et al.*, 2006).

Miranda *et al.*, 2019, ao investigarem possíveis alterações na homeostase intestinal de camundongos NOD e sua relação com o desenvolvimento de DM1, mostraram que a integridade da barreira intestinal tem papel fundamental na patogênese desta doença, uma vez que camundongos NOD com 4-6 semanas de idade já apresentam várias alterações nas funções de barreira da mucosa intestinal, como menor frequência de células caliciformes no intestino delgado, diminuição de produção de muco no cólon e diminuição da produção de IgA. Essas alterações nas funções de barreira da mucosa intestinal de camundongos NOD aumentam em quase três vezes a translocação de bactérias do intestino para o linfonodo pancreático antes do início do desenvolvimento do diabetes, em relação ao controle. Tais alterações na barreira epitelial intestinal, que levam a translocação de bactérias para o linfonodo pancreático, também são observados em camundongos tratados com estreptozotocina (STZ), um outro modelo muito bem estabelecido para o estudo do

DM1. Nestes camundongos, a translocação de bactérias para o linfonodo pancreático ativa o receptor NOD2, levando a diferenciação de células Th1 e Th17, que contribuem para o desenvolvimento do DM1 (Costa *et al.*, 2016). Rouland *et al.*, 2021 mostraram que a progressão do DM1 em camundongos NOD está associada a várias alterações da mucosa intestinal, como diminuição na produção de IL-22, IL-17A, diminuição da expressão de fucosiltransferase 2 (FUT2) - que é expressa por células epiteliais (ECs, do inglês *Epithelial cells*) em resposta a produção de IL-22 e representa um mecanismo protetor na manutenção da microbiota intestinal e proteção do hospedeiro contra infecções oportunistas - e uma diminuição drástica de SFB. Além disso, Miranda *et al.*, 2019 mostraram que o *cross-fostering* de filhotes recém-nascidos de mães NOD para mães NOR foi eficaz para a normalizar a frequência de células caliciformes nos intestinos delgado e grosso de camundongos NOD, sugerindo uma relação entre da microbiota nas alterações de barreira observadas na mucosa intestinal destes animais.

Desta forma, levando em consideração o papel da quebra da homeostase intestinal no desenvolvimento do DM1, neste projeto buscamos avaliar o efeito de um único episódio de infecção gastrointestinal aguda no desenvolvimento de diabetes autoimune, com a hipótese de que a quebra da homeostase intestinal causada pela infecção por *YP* contribuiria para a exacerbação na patogênese do DM1 em camundongos suscetíveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos geral:

Determinar o impacto de infecção gastrointestinal aguda por *YP* sobre a suscetibilidade ao diabetes autoimune.

2.2. Objetivos específicos:

- Padronizar o modelo experimental de DM1 por protocolo “*multiple low doses of streptozotocin*” (MLD-STZ) e do protocolo de infecção por *YP*;
- Determinar se o processo autoimune é atenuado ou agravado pela infecção por *YP* em modelo animal de diabetes tipo 1 espontâneo (NOD) e MLD-STZ;
- Caracterizar a resposta imunológica no pâncreas após a infecção por *YP*;
- Avaliar a contribuição da microbiota alterada pela infecção por *YP* no desenvolvimento do DM1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Camundongos

Camundongos fêmeas C57BL/6 foram obtidos do Biotério de Criação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICB-USP) mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do ICB-USP em gaiolas microisoladoras, com ar filtrado, ração, água e maravalha esterilizadas, em condições livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogens Free*) e com ciclo claro/escuro controlados.

Casais de camundongos NOD (NOD/ShiLtJ - *Non-Obese Diabetic*) e NOR (NOR/LtJ) foram cedidos pela professora Dr^a Ana Maria Caetano de Faria da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram criados no mesmo local e nas mesmas condições supracitadas. As fêmeas resultantes do acasalamento foram utilizadas para os experimentos. Todos os camundongos infectados foram mantidos em biotérios com nível de biossegurança 2 adequado para o manuseio do patógeno. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à análise e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais local (CEUA/ICB-USP, n° 8571030321).

3.2. Infecção gastrointestinal por *YP*

A bactéria *YP* (cepa IP 32777), cedida pelo Dr. Igor Brodsky (University of Pennsylvania) foi semeada em meio MacConkey e após 48h de crescimento a 25°C, uma colônia foi coletada e cultivada em meio 2XYT a 25°C por 16 h. Foi medida a densidade óptica (DO) da cultura e interpolada em curva previamente padronizada (Fonseca *et al.*, 2015) para a quantificação das bactérias viáveis. Após atingirem um peso mínimo de 18 g (aproximadamente 8 semanas de vida), os camundongos foram submetidos a jejum de 12 h no dia anterior à infecção. Foi então realizada a gavagem de 200 µL contendo 1×10^7 unidades formadoras de

colônia (CFU, do inglês *Colony Forming Unit*) da bactéria ressuspendidas em solução salina estéril.

3.3. Indução do diabetes tipo 1 por *MLD-STZ*

Para indução do DM1 foi utilizado protocolo “*multiple low doses of streptozotocin* (MDL-STZ)”. Para determinação da dose ideal, os camundongos foram divididos em três grupos e receberam injeções intraperitoneais (i.p.) diárias de 55, 65 e 175 mg/kg de estreptozotocina (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) dissolvida em um tampão de citrato de sódio 0,1 M (pH 4,5) por cinco dias consecutivos. Os níveis de glicose no sangue, peso e a incidência de diabetes foram monitorados semanalmente. Foram considerados diabéticos camundongos com níveis de glicose ≥ 200 mg/dL após dois dias consecutivos. Após o desenvolvimento do diabetes, os camundongos foram eutanasiados por dose excessiva de anestésicos (cetamina e xilazina - Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda) tiveram seus órgãos coletados para experimentos descritos adiante. Uma vez padronizado o protocolo em camundongos *naives*, o mesmo foi utilizado para a indução do DM1 em camundongos previamente infectados por YP (3-4 semanas pós-infecção).

3.4. Avaliação de DM1 em camundongos NOD/NOR

Para a avaliação do desenvolvimento de DM1 nos camundongos NOD/NOR foi utilizado como base o trabalho de Miranda *et al.*, 2019. Os camundongos tiveram os níveis glicêmicos medidos semanalmente através de amostra de sangue periférico da cauda dos camundongos em fitas de dosagem adequadas para glicosímetro automático (Accu-Check Active, Roche, Basel, Suíça). Foram considerados diabéticos camundongos que apresentaram glicemia acima de 250 mg/dL após dois dias consecutivos. Após o desenvolvimento do DM1, os camundongos foram eutanasiados por dose excessiva de anestésicos (cetamina e xilazina - Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda) e tiveram seus órgãos coletados para experimentos descritos adiante.

3.5. Teste de tolerância à glicose (GTT)

Para o teste de tolerância à glicose, os camundongos foram colocados em jejum 12h antes da realização do experimento. Imediatamente antes do início do experimento os camundongos foram pesados e tiveram sua glicemia medida (tempo 0) e então receberam injeção i.p. de glicose (2 g/Kg). A glicemia no sangue foi monitorada nos minutos 0, 15, 30, 60, 90 e 120. nutos 15, 30, 60, 90 e 120.

3.6. Histologia

Após a eutanásia dos camundongos, o pâncreas foi coletado e fixado em formaldeído 10% por 24 h e então armazenado em etanol 70%. As amostras foram então desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clarificadas em xilol e então emblocadas em parafina, cortadas em 5 µm, colocadas em lâminas tratadas com poli-lisina e coradas com hematoxilina e eosina (HE). As ilhotas foram analisadas de acordo com a presença ou não de insulite e o grau de insulite foi classificado segundo o seguinte escore : sem insulite, peri-insulite, (presença de infiltrado celular na periferia da ilhota), moderado (<50% da ilhota acometida) e grave (>50% da ilhota acometida).

3.7. Coleta e processamento de células do pâncreas

Para o processamento das células do pâncreas, estes órgãos foram coletados em uma placa de 24 contendo 1 mL de meio DMEM (Meio Dulbecco MEM - Sigma-Aldrich) contendo 50 mM de HEPES e 1% de BSA pobre em ácidos graxos e mantidos em gelo em meio. Os pâncreas foram então transferidos para uma nova placa contendo solução de digestão de meio DMEM (Sigma-Aldrich) contendo 1% de Albumina Sérica Bovina (BSA, bioWorld), colagenase IV (Sigma) (0,5mg/mL) e DNase I (Sigma) (0,25mg/mL). Após digestão por 25 min a 37°C, o tecido foi macerado, filtrado em *cell strainer* de 70 µm e a digestão foi pausada com solução *stop* contendo meio DMEM/HEPES/BSA com 2µL/mL de EDTA (do inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid) a 5mM (Nova Biotecnologia). A solução foi então centrifugada a 1600 rpm, por 8 min a 4°C e o pellet foi ressuspensão em RPMI

(Sigma, St. Louis MO) em um tubo cônico de 15 mL. Foi então adicionado 6 mL/amostra de Percoll (GE Healthcare) diluído a 37,5% em RPMI incompleto ou HBSS (Hyclone), centrifugado a 1700 rpm, durante 20 min, a 4°C. Então, o sobrenadante foi aspirado com bomba a vácuo e o *pellet* ressuspenso em meio RPMI (Sigma) contendo 5% SFB (Hyclone), L-glutamina, penicilina/estreptomicina e β -mercaptoetanol (Hyclone)

3.8. Citometria de fluxo

As amostras da suspensão celular foram processadas para identificação de moléculas de superfície, intracelulares e intranucleares por citometria de fluxo de acordo com as especificações dos fabricantes (BD Biosciences e eBiosciences). Resumidamente, as células foram incubadas com sonda de viabilidade celular (*Live/Dead* Thermo Fisher), seguida de lavagem e incubação com tampão PBS contendo 1% de SFB (HyClone) na presença de diferentes anticorpos monoclonais. Foram identificadas as seguintes populações: neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células TCD4+ e TCD8+. Paralelamente, foi realizada a permeabilização nuclear para identificação de fatores de transcrição e citocinas intracelulares. Os anticorpos, seus respectivos clones e fluorocromos utilizados encontram-se na tabela abaixo:

Fluorocromo	Painel 1	Painel 2
FITC	CD45 (30-F11)	CD45 (30-F11)
PERCP	Ly6C (HK1.4)	IL-17 (eBio17B7)
PE	SiglecF (1RNM44N)	
PECF594	Ly6G (1A8)	
Pecy7	F4/80 (BM8)	IFN γ (XMG1.2)
AF700	MHCII (M5/114.15.2)	CD8b (RPA-T8)
AF780	TCR-b (H57-597)	TCR-b (H57-597)
BV421		FOXP3

		(FJK-16s)
BV510	LD	LD
BV605	CD11b (M1/70)	CD4 (RM4-5)
BV785	CD11c (N418)	Thy 1.2 (30-H12)

Tabela 1: Relação de anticorpos e seus respectivos clones e fluorocromos utilizados para painel de citometria de fluxo.

As leituras foram realizadas no equipamento BD Fortessa-X20 e analisadas no software FlowJo, de acordo com as estratégias de *gate* apresentadas nas Figuras 2 e 3.

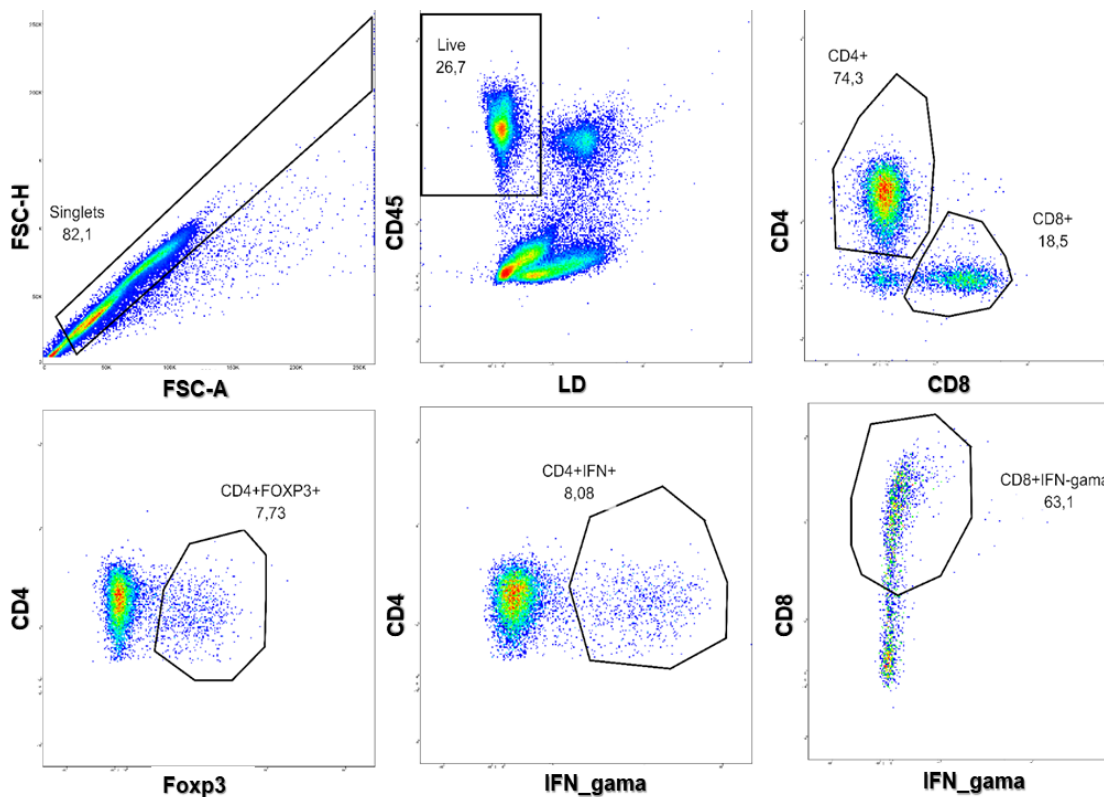


Figura 2. Estratégia de *gates* para painel de resposta imune adaptativa. Primeiramente foram adquiridos os *Singlets* (FSC-H/FSC-A), seguido da seleção dos leucócitos vivos (CD45+LD-). Em seguida foi separada a população de células TCR β +Thy 1.1+. Dentro desta população, foram separadas as populações de células TCD4+ e TCD8+. Dentro da população de células TCD4+, foi analisada a presença dos marcadores Foxp3 e IFN- γ . Dentro da população de células TCD8+ foi analisada a presença de IFN- γ .

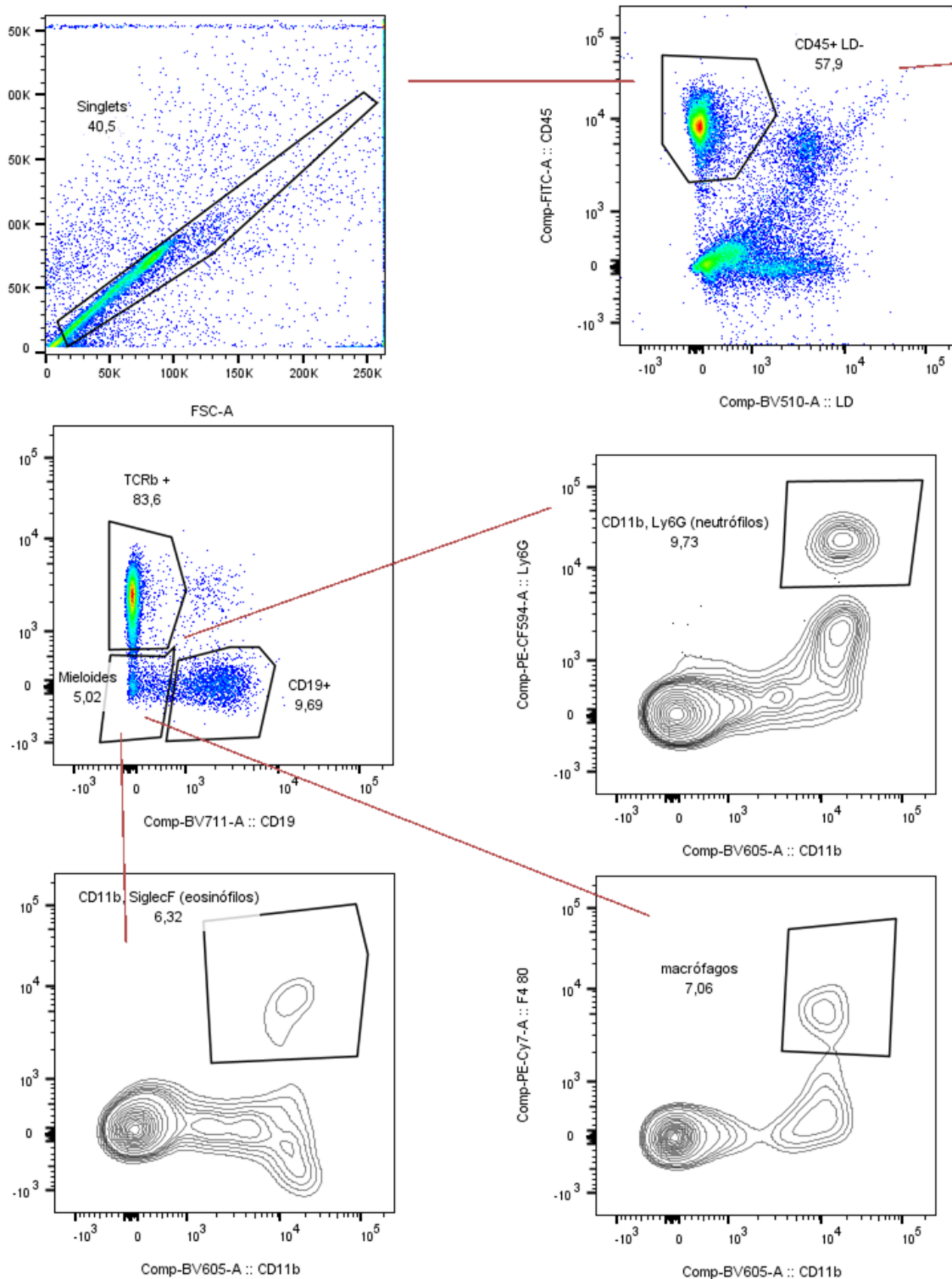


Figura 3. Estratégia de gates para o painel de células da imunidade inata. Para a análise das células da imunidade inata primeiramente foram adquiridos os Singlets (FSC-H/FSC-A), seguido da seleção dos leucócitos vivos (CD45+LD-). Em seguida foi separada a população de células mielóides pela exclusão de linfócitos T e linfócitos B (TCRb+ e CD19+ respectivamente). A partir da

população células mielóides foram selecionadas as seguintes populações: neutrófilos (CD11b+Ly6G+), eosinófilos (SiglecF+F480+), macrófagos (F480+Cd11b+).

3.9. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Para a titulação sérica de auto-anticorpo contra IAA (do inglês, *Insulin Auto Antibodies*) uma placa própria para ELISA foi sensibilizada com 100 µL/poço de insulina diluída em tampão de sensibilização (tampão carbonato) na concentração de 10 µg/mL. Após incubação overnight a 4°C, a placa foi lavada com 300 µL/poço de tampão de lavagem (PBS 1x-0,05% de Tween 20 (LGC Biotecnologia)) por 5 vezes. Reações inespecíficas foram bloqueadas com 200 µL/poço de tampão bloqueio (PBS 1x-0,05% de Tween 20 e 10% SFB(HyClone)) em incubação por 1 h a 37°C. Após este período, a placa foi lavada 3 vezes conforme descrito anteriormente e então foi aplicado 100 µL das amostras diluídas em tampão de bloqueio, reservando dois poços para adicionar apenas tampão bloqueio para serem usados como branco, e então a placa foi vedada e incubada a 37°C por 2 h. Após este período, a placa foi lavada 3 vezes conforme descrito anteriormente e então foi adicionado 100 µL/poço de anticorpo com biotina (Anti-mouse IgG, BD) diluído (na concentração 1:1000) em tampão bloqueio e incubado durante 1 h a 37°C. Passada 1 hora de incubação com o anticorpo biotinilado, a placa foi lavada como descrito anteriormente e foi adicionado 100 µL/poço da solução de streptavidina (tampão bloqueio-0,05% Tween 20 + streptavidina HRP (BD) na concentração de 1:1000) e incubado por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Passados 30 min da incubação com a solução de streptavidina, a placa foi lavada conforme descrito anteriormente e foi adicionado 100 µL/poço da solução de revelação TMB Substrato BD Opteia e incubado por 30 min no escuro à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de H₂SO₄ a 16% (solução de parada) e a leitura foi feita a 450 nm e 570 nm no leitor de ELISA (EPOCH2 Microplate Reader, BioTek) considerando os poços deixados para o branco.

3.10 Ensaio de detecção de anticorpos ligados à microbiota por citometria de fluxo

Foram coletadas fezes de camundongos C57BL/6 YP e NV que passaram por

protocolo de indução de DM1 por MLD-STZ (65mg/kg). Estas foram pesadas e diluídas em PBS 1x (50 mg/mL), filtradas em filtro de 0.22 µm, seguido de filtragem em cell strainer de 70 µm. Após 5 minutos para deposição do conteúdo fecal no fundo dos eppendorfs 50 µL dos sobrenadantes foi plaqueado em placa de 96 poços, seguido de centrifugação (7 min/4°C/4000 RPM). Foi adicionado 200 µL de staining buffer (PBS 1x/1% BSA filtrado em filtro de 0.22 µm) seguido de mais uma centrifugação (5 min/4°C/4000RPM). As amostras foram ressuspensas em 50 µL de staining buffer contendo 1:100 SYTO-APC (marca bactérias gram-positivas e gram-negativas vivas ou mortas), 1:100 IgA-PE. Foram feitas mais três lavagens e então as amostras foram adquiridas no BD LSRFortessa™ X20.

3.11. Análise de translocação de microbiota intestinal

Para análise da translocação da microbiota intestinal, amostras de pâncreas, fígado, linfonodos mesentéricos, pancreáticos e baço foram homogeneizadas em condições estéreis, plaqueadas diferentes meios de cultura (TSA e MacConkey) e cultivadas em estufa à 37°C para contagem de unidades formadoras de colônia (CFU).

3.12. Transplante de microbiota

Para o protocolo de transplante de microbiota fecal camundongos C57BL/6 previamente infectados com YP tiveram conteúdo de cecum coletado e homogeneizado em PBS (200 mg/mL) em condições anaeróbicas. Foi adicionado às amostras glicerol 40% 1:1 e as mesmas foram então congeladas. No momento do transplante, camundongos NOD com aproximadamente 3 semanas de vida receberam 200 µL de conteúdo fecal transferido via gavagem em 3 dias alternados.

3.13. Análise Estatística

Toda análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) utilizando One Way Anova e Two Way Anova. Foram considerados valores estatisticamente significativos aqueles com $P < 0,05$.