

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

FRANCIELLY MOREIRA

IMPACTO DAS INFECÇÕES GASTROINTESTINAIS AGUDAS NA CAPACIDADE DO
HOSPEDEIRO EM INDUZIR IMUNIDADE DE MUCOSA DO TIPO 2

SÃO PAULO

2023

FRANCIELLY MOREIRA

**IMPACTO DAS INFECÇÕES GASTROINTESTINAIS AGUDAS NA CAPACIDADE DO
HOSPEDEIRO EM INDUZIR IMUNIDADE DE MUCOSA DO TIPO 2**

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
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Moreira, Francielly

Impacto das infecções gastrointestinais agudas na capacidade do hospedeiro em induzir imunidade de mucosa do tipo 2. / Francielly Moreira; orientadora Denise Morais da Fonseca. -- São Paulo, 2023.

110 p.

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

1. Infecção gastrointestinal aguda. 2. Mesentério. 3. Resposta do tipo 2. 4. Acetilcolina. I. Morais da Fonseca, Denise, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Francielly Moreira

Título da Dissertação: Impacto das infecções gastrointestinais agudas na capacidade do hospedeiro em induzir imunidade de mucosa do tipo 2.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, 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 "Eixo intestino-pulmão: compreendendo os efeitos de infecções intestinais agudas sobre o desenvolvimento de câncer intestinal e pulmonar.", protocolada sob o CEUA nº 5807220222, sob a responsabilidade de **Denise Morais da Fonseca** e equipe; *Leonardo Mandu Gonçalves ; Jofer Andree Zamame Ramirez; Francielly Moreira; Guilherme William da Silva; Gabriele Manamy Rodrigues* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais 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 09/05/2022.

We certify that the proposal "Gut-lung Axis: understanding the effects of gut acute episodes of infection for lung and gut tumor development", utilizing 825 Isogenics mice (825 females), 544 Genetically modified mice (GMO) (544 females), 132 Spontaneous mutant mice (132 females), protocol number CEUA 5807220222, under the responsibility of **Denise Morais da Fonseca and team**; *Leonardo Mandu Gonçalves ; Jofer Andree Zamame Ramirez; Francielly Moreira; Guilherme William da Silva; Gabriele Manamy Rodrigues* - 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 05/09/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Espécie:	Camundongos isogênicos			N amostral:	825
Linhagem:	C57BL/6				
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)			N amostral:	180
Linhagem:	RAG-/- (B6.129S7-Rag1tm1Mom/J)				
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)			N amostral:	40
Linhagem:	Foxp3-GFP (Foxp3 ^{tm1Kuch})				
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Espécie:	Camundongo mutante espontâneo			N amostral:	66
Linhagem:	NOD (Non-Obese Diabetic)				
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Espécie:	Camundongo mutante espontâneo			N amostral:	66
Linhagem:	NOR (Non-Obese Resistent)				
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)			N amostral:	30
Linhagem:	OTI (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J)				

Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	OTII (B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J),			N amostral:	30
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	C67BL/6.CD45.1 (B6.SJL-Ptprc ^{ja} Pepc			N amostral:	264

São Paulo, 10 de maio de 2022



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

*Dedico este trabalho a minha família, em especial meus pais **Waldeci e Odete**, meu irmão **Chrystian**, e a todos que fizeram parte desta trajetória*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por me proteger e me dar forças para continuar quando mais precisei, acalmando meu espírito e minha mente. O Senhor é minha fortaleza quando necessito de refúgio.

Aos meus pais, **Odete** e **Waldeci**, que sempre me ensinaram o valor de se ter uma boa educação, e de sempre lutar por seus sonhos. Sem vocês eu jamais conseguiria ter chegado até aqui. Sou grata por todo apoio, amor e carinho e pela preocupação com a minha condição física e mental. Saibam que eu possuo um orgulho imenso em ter pais maravilhosos como vocês.

Também sou grata pelo apoio do meu irmão **Chrystian**, que sempre foi um ótimo conselheiro e amigo, te considero uma grande inspiração, tanto profissional quanto pessoal. A minha cunhada **Adeline** por todas as palavras carinhosas e conselhos.

As minhas primas **Keila** e **Jackeline**, que considero como irmãs, já passamos por diversos momentos juntas e nossa amizade continua se fortalecendo, e mesmo em meio a tanta correria sempre estivemos presentes uma para outra. Amo muito vocês e sou grata por nossa amizade. Ao meu tio **Vanis** e minha tia **Marta**, que sempre me acolheram e ajudaram através de uma palavra de conforto.

A minha amiga **Sara** que mesmo morando no Japão, sempre foi muito atenciosa e me deu muita força em momentos delicados. Agradeço por dispor de seu tempo para conversarmos e me animar.

À minha orientadora **Profa. Dra Denise Morais da Fonseca** por me permitir fazer parte de seu laboratório e pela confiança, por todo aprendizado e ajuda a cada experimento e também através de aulas e discussões científicas sanando minhas dúvidas. Agradeço sua paciência, seus conselhos, e por me ajudar a crescer profissionalmente.

Aos meus amigos e companheiros do **Laboratório de Imunologia de Mucosas – LabIM**, **Léo**, **Bernardo** e **Gui**, que foram os primeiros a me acolher e sempre estiveram presentes em todos os experimentos, e nunca se negaram a ajudar mesmo que houvesse dificuldades. Nosso trabalho em grupo sempre foi importante para o meu desenvolvimento e sou muito grata por ter dividido esse momento com vocês. Vocês são exemplos de dedicação e resiliência, tenho certeza que terão uma jornada brilhante.

Aos meus amigos e mestres **Caio** e **Marina**, por compartilharem comigo seu aprendizado científico e me ajudarem com minhas dúvidas, além de serem referência de esforço e empenho em relação à rotina acadêmica. Também sou grata por todos os conselhos e momentos de descontração que tivemos. Agradeço também a **Gabi**, aluna dedicada que sempre me ajudou na bancada, e com outras tarefas do laboratório. Obrigada por sua amizade.

Aos novos membros do LaBIM, **Drs. Erick, Marcelo** e **Giovanni**, por me darem diversas dicas sobre como melhorar meu trabalho acadêmico, desde como desenvolver uma ideia até chegar em sua estrutura final, além do auxílio na bancada. Agradeço pela paciência e companheirismo. Ao ex-aluno do LaBIM, **Dr. Jofer**, que também me ajudou nessa jornada, muito obrigada por todos os momentos de descontração mesmo quando estávamos cansados ao fim de um longo experimento, e por compartilhar seu conhecimento.

Aos meus amigos de departamento, **Luís, Luísa, Jefferson, Carol, Isis** e **Josi**, os quais tive o prazer de conhecer, e que me ajudaram a crescer cientificamente, além de tornar essa trajetória mais leve mesmo com todos os desafios da pós-graduação.

Agradeço imensamente a todos os professores e funcionários do departamento de imunologia, que sempre me trataram com muita gentileza e educação, e foram solícitos quando tive dificuldades. Obrigada por compartilharem o conhecimento e a sabedoria dos senhores(as) comigo. Agradeço aos funcionários do **CEFAP**, e em especial agradeço as técnicas **Raquel, Eliane, Jô** e **Sandra**, por me ajudarem desde aprender como se usa uma autoclave, até a realização de experimentos mais complexos. Também agradeço aos ex-técnicos de operação de microscopia confocal **Natália** e **Ricardo**, por me auxiliar com as imagens e dispor de longos períodos de busca até conseguirmos o resultado. Aos funcionários do biotério **Joelma** e **Luciano** que me auxiliaram com as trocas e manutenção dos animais. Aos senhores da portaria, em especial **Otacílio**, e ao setor de limpeza, por manterem nosso ambiente sempre limpo e organizado, agradeço também a secretaria da pós-graduação em especial a senhora **Maria Eni**. Saibam que nenhum trabalho seria capaz de ser realizado sem a ajuda de todos vocês.

Por fim agradeço às agências de fomento que contribuíram com auxílio financeiro para que este trabalho pudesse ser realizado **CAPES** (PROEX) (Processo 327964/2019-01), **FAPESP** (Processos 2015/25364-0, 2019/14026-8 e 2021/06881-5), e **CNPq**.

Este trabalho foi realizado sob orientação da Prof. Dr.^a Denise Morais da Fonseca, desenvolvido 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 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, do Conselho de Apoio à Pesquisa no Ensino Superior - CAPES (PROEX) (Processo 327964/2019-01), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 2015/25364-0, 2019/14026-8 e 2021/06881-5).

RESUMO

MOREIRA, F. **Impacto das infecções gastrointestinais agudas na capacidade do hospedeiro em induzir imunidade de mucosa do tipo 2**. 2023. 110f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A mucosa intestinal está em contato próximo com uma população diversa de comensais, que proporcionam uma digestão eficiente dos alimentos e contribuem para a homeostase intestinal. Leucócitos especializados residem na mucosa intestinal e redes reguladoras garantem a prevenção da inflamação desencadeada por antígenos inócuos e proteção contra agentes patogênicos. A quebra dessas respostas canônicas de barreira podem resultar no desenvolvimento de distúrbios inflamatórios. Nesse contexto, nosso grupo demonstrou que um único episódio de infecção gastrointestinal aguda por *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) em camundongos foi capaz de induzir um fenômeno denominado “cicatriz imunológica”, que pode levar à falência da imunidade da mucosa a longo prazo. Esse processo começa com danos irreversíveis aos vasos linfáticos intestinais, o que compromete a migração de células dendríticas para os linfonodos de drenagem e impacta a indução de células T intestinais efetoras e reguladoras. Este fenômeno acarreta em uma falha permanente na manutenção da compartimentalização da microbiota e no remodelamento do sistema imunológico associado ao mesentério, marcado pela presença de infiltrado inflamatório Tipo 1 e perda de células homeostáticas do Tipo 2, incluindo linfócitos Th2, células linfóides inatas tipo 2, macrófagos M2 e eosinófilos. Nos últimos anos, nosso grupo tem estudado possíveis estratégias de reversão do remodelamento do mesentério e reconstituição do componente imunológico do tipo 2 no mesentério e intestino. Entretanto não obtivemos sucesso, indicando uma resistência à montagem de novas respostas do tipo 2 nestes tecidos. Em paralelo, e de forma relevante para o presente trabalho, dados anteriores do nosso grupo mostraram que a sinalização pela acetilcolina controla a produção de IL-33 no mesentério, e também dos componentes do tipo 2, de forma que a ablação da sinalização da acetilcolina aumentou a produção local de IL-33 e, conseqüentemente, todos os subtipos celulares do tipo 2. Nosso objetivo neste trabalho foi estudar o impacto da infecção intestinal aguda sobre o tônus imunológico (tipo 2) no mesentério e mucosas, assim como os mecanismos envolvidos neste fenômeno. Inicialmente, em uma tentativa de restaurar a imunidade do tipo 2 no mesentério e intestino, animais C57BL/6 previamente infectados por YP e naives, foram imunizados com ovalbumina (Ova) + alum seguido do desafio oral com Ova. Nos animais infectados, este método se mostrou eficaz em promover a resposta do tipo 2 sistêmica, marcada pela presença de anticorpos IgG1 Ova-específicos no soro. Contudo, não houve a recuperação da resposta local do tipo 2 no mesentério e intestino. Para verificar se a infecção comprometeu esta resposta em outros tecidos de mucosa como a pulmonar, utilizamos um modelo de asma induzido por via intranasal. Na análise histológica notamos infiltrado inflamatório adjacente às vias aéreas com a presença de eosinófilos, sendo capaz de desenvolver respostas Th2 mesmo após a infecção. Em uma outra abordagem, verificamos se a infecção por YP poderia promover o aumento da liberação de acetilcolina e o conseqüente bloqueio da liberação de IL-33, diminuindo o tônus do tipo 2 no mesentério. As imagens de microscopia confocal de animais ChAT-Reporter infectados com YP, mostram a perda das fibras ChAT⁺ associadas à presença de FALCs e também uma co-localização entre os leucócitos mesentéricos e expressão de ChAT. Além disso notamos uma diminuição da expressão de ST2 em células linfóides do tipo 2 através da citometria de fluxo. Em animais IL-33gfp infectados, uma redução da liberação de IL-33 pelo epitélio intestinal foi observada. Esses dados sugerem que, após a infecção por YP, há uma liberação local de ACh pelos leucócitos dos FALCs do mesentério bloqueando o retorno do tônus tipo 2, associado à uma falha na expressão de ST2, e um prejuízo na produção de IL-33 pelas células epiteliais. No entanto, esses efeitos são compartimentalizados, ocorrendo localmente, mas não de modo sistêmico em outros tecidos de mucosa.

Palavras-chave: Infecção gastrointestinal aguda, Mesentério, Resposta do tipo 2, Acetilcolina.

ABSTRACT

MOREIRA, F. **Impact of acute gastrointestinal infections in the host capacity to induce mucosal type 2 immunity**. 2023. 110f. Master thesis (Immunology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

The intestinal mucosa is in close contact with a diverse population of commensals, which provide efficient food digestion and contribute to intestinal homeostasis. Specialized leukocytes reside in the intestinal mucosa, and regulatory networks ensure the prevention of inflammation triggered by harmless antigens and protection against pathogens. Disrupting these canonical barrier responses can lead to the development of inflammatory disorders. In this context, our group has demonstrated that a single episode of acute gastrointestinal infection by *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) in mice could induce a phenomenon called "immunological scar," which can result in long-term impairment of mucosal immunity. This process begins with irreversible damage to the intestinal lymphatic vessels, compromising the migration of dendritic cells to draining lymph nodes and impacting the induction of effector and regulatory T cells in the intestine. This phenomenon leads to a permanent failure in maintaining the compartmentalization of the microbiota and in the remodeling of the mesentery-associated immune system, marked by the presence of type 1 inflammatory infiltrate and loss of homeostatic type 2 cells, including Th2 lymphocytes, innate type 2 lymphoid cells, M2 macrophages, and eosinophils. In recent years, our group has been studying possible strategies to reverse mesentery remodeling and reconstitute type 2 immune components in the mesentery and intestine. However, we have not been successful, indicating resistance to mounting new Type 2 responses in these tissues. In parallel and relevant to this study, previous data from our group showed that acetylcholine signaling controls IL-33 production in the mesentery, as well as type 2 components, such that ablation of acetylcholine signaling increased local IL-33 production and consequently all type 2 cellular subtypes. Our objective in this work was to study the impact of acute intestinal infection on Type 2 immune tone in the mesentery and mucosae, as well as the mechanisms involved in this phenomenon. In an attempt to restore Type 2 immunity in the mesentery and intestine, C57BL/6 mice previously infected with YP and naïve animals were immunized with ovalbumin (Ova) + alum, followed by an Ova oral challenge. In the infected animals, this method effectively promoted a systemic Type 2 response, marked by the presence of Ova-specific IgG1 antibody in serum. However, there was no recovery of the local type 2 response in the mesentery and intestine. To verify if the infection compromised this response in other mucosa such as the lungs, we used a model of intranasal-induced asthma. Histological analysis revealed infiltrates adjacent to the airways with the presence of eosinophils, indicating the ability to develop Th2 responses even after the infection. In another approach, we investigated whether YP infection could promote an increase in acetylcholine release and subsequent blockage of IL-33 release, reducing type 2 tone in the mesentery. Confocal microscopy images of ChAT-Reporter-YP infected mice showed the loss of ChAT⁺ fibers associated with the presence of FALCs and also a co-localization between mesenteric leukocytes and ChAT expression. Additionally, a decrease in ST2 expression in type 2 lymphoid cells was observed through flow cytometry. In infected IL-33^{gfp} animals, a reduction in IL-33 release by the intestinal epithelium was observed. These data suggest that, after YP infection, there is local ACh release by FALC leukocytes in the mesentery, blocking the return of type 2 tone, associated with a failure in ST2 expression, and impairment in IL-33 production by epithelial cells. However, these effects are compartmentalized, occurring locally but not systemically in other mucosal tissues.

Keywords: Acute gastrointestinal infection. Mesentery. Type 2 response. Acetylcholine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estratégia de <i>gate</i> utilizada para identificação das populações de células mielóides e linfóides.	46
Figura 2- Estratégia de <i>gate</i> utilizada para identificação das populações de células mielóides e linfóides e expressão dos receptores ST2 e KLRG1.	47
Figura 3- Estratégia de <i>gate</i> utilizada para identificação das populações de células de origem linfóide.	48
Figura 4- Estratégia de <i>gate</i> utilizada para análise de produção de citocinas.	49
Figura 5- Análise “t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE).	50
Figura 6 – Caracterização das populações celulares mielóides e linfóides após a promoção da resposta tipo 2 em modelo murino no mesentério.	54
Figura 7 – Caracterização das populações celulares linfóides e produção de citocinas após a promoção da resposta tipo 2 em modelo murino no mesentério.	55
Figura 8- Caracterização das populações celulares mielóides após promoção da resposta tipo 2 em modelo murino no intestino delgado.	56
Figura 9- Caracterização das populações celulares linfóides após a promoção da resposta tipo 2 em modelo murino no intestino delgado.	57
Figura 10- Análise qualitativa de anticorpos IgG1, IgG2a e IgA por ELISA no soro após a promoção da resposta imunológica do tipo 2 (Protocolo 1).	59
Figura 11- Análise de células leucocitárias no lavado broncoalveolar em animais submetidos ao modelo de indução de asma (Protocolo 2).	61
Figura 12- Micrografia do tecido pulmonar de animais submetidos ao modelo de asma.	63
Figura 13- Micrografia do tecido pulmonar com infiltrado inflamatório leucocitário em animais submetidos ao modelo de asma.	64
Figura 14– Produção de IL-33 em animais IL-33gfp ^{+/-} naives ou infectados com YP em células CD45 negativas pulmonares.	65
Figura 15– Caracterização das populações de células de origem linfóide e mielóide no mesentério de animais ChAT-Reporter naive ou infectados por YP.	69
Figura 16- Caracterização das populações de células de origem linfóide no mesentério de animais ChAT-Reporter naive ou infectados por YP.	70
Figura 17- Análise da expressão dos marcadores de superfície ST2 e KLRG1 em ILCs no mesentério de animais ChAT naive e infectados por YP.	72
Figura 18- Análise da expressão dos marcadores de superfície ST2 e KLRG1 em linfócitos T no mesentério e linfonodos mesentéricos de animais ChAT naive e infectados por YP.	73
Figura 19– Imagem representativa das fibras parassimpáticas no mesentério de animais ChAT-Reporter.	79
Figura 20– Expressão de ChAT–Tdtomato em células não leucocitárias e leucocitárias no mesentério de animais ChAT-Reporter naive ou infectados por YP.	84
Figura 21- Produção de IL-33 nas células CD45- do mesentério de animais IL-33 ^{+/-} gfp naive ou previamente infectados por YP.	87
Figura 22– Produção de IL-33 em animais IL-33gfp ^{+/-} naive ou infectados com YP em enterócitos do intestino delgado.	89

Figura 23 – Presença de GFP (Green Fluorescence Protein) em animais IL-33gfp^{-/-} naive ou infectados com YP em enterócitos do intestino delgado. 89

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1– Cicatriz imunológica.	27
Esquema 2– Imagem demonstrativa da hipótese.	28
Esquema 3- Delineamento experimental para promoção de resposta imunológica do tipo 2 utilizando Ova (Protocolo 1).	39
Esquema 4- Delineamento experimental para indução de asma alérgica em modelo murino (Protocolo 2).	41
Esquema 5- Modelo proposto para conclusão dos dados apresentados.	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

Adr – Adrenalina

ADSC – *Adipocyte derived stem cell*

BAL - lavado bronco-alveolar (*bronchoalveolar lavage*)

BSA – Albumina total bovina (*bovine serum albumin*)

CD – Cluster de diferenciação

CEFAP – Centro de apoio e facilidades à pesquisa – ICB

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação

ChAT - Colina Acetiltransferase (*Choline Acetyltransferase*)

CTLA4 - *Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*

DCs – Células dendríticas (*Dendritic Cells*)

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

FALC – *Fat Associated lymphoid cluster*

FOXP3 - *forkhead box P3*

GFP – *Green Fluorescent protein*

HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*

HE – Hematoxilina e eosina

IBD – Doenças inflamatórias intestinais (*Inflammatory Bowel Diseases*)

ICB – Instituto de Ciência Biomédicas

IELs - Linfócitos intraepiteliais (*intraepithelial lymphocytes*)

IFN γ – Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

ILC – Célula linfóide inata (*Innate Lymphoid Cells*)

KLRG1 - *Killer cell lectin receptor G1*

LPS – Lipopolissacarídeos

mAChRs – Receptores muscarínicos

MFI – Intensidade média de Fluorescência (*Median Fluorescence Intensity*)

mL – Mililitros

MLNs – Linfonodo Mesentérico (*Mesenteric Lymph Nods*)

NA – Noradrenalina

NACHR – Receptores nicotínicos

NK – *Natural Killer*

OVA – Ovalbumina

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*)

PAMs – Peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial peptides*)

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors*)

RPMI – meio “*Roswell Park Memorial Institute*”

SCFAs – Ácidos graxos de cadeia curta (*Short-chain fatty acids*)

SFB - Bactéria segmentada filamentosa (*Segmented filamentous bacteria*)

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso parassimpático

SNS – Sistema nervoso simpático

ST2 - *Serum stimulation-2*

TCR – Receptor de célula T (*T cell receptor*)

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta (*Transforming growth factor beta*)

Th – T auxiliar (*T helper*)

TL - *Thymus Leukemia*

TLRs - Receptores do tipo Toll-like (*Toll-like Receptors*)

TNF – Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*)

Tregs – Células T reguladoras (*Regulatory T cells*)

TSLP – linfopoetina estromal tímica (*Thymic stromal lymphopoietin*)

tSNE – *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*

UMAP - *Uniform Manifold Approximation and Projection*

VACht – Transportador vesicular de acetilcolina (*Vesicular acetylcholine transporter*)

YP – *Yersinia pseudotuberculosis*

μ L – Microlitros

SUMÁRIO

1. Introdução	20
1.1 - Componentes imunológicos e microbiota na mucosa intestinal	20
1.2 - O impacto das infecções gastrointestinais na mucosa intestinal	25
1.3 - O tecido adiposo e suas funções fisiológicas e imunológicas	29
1.4- Mesentério como um novo órgão e componente da barreira imunológica intestinal	31
1.5 - Comunicações do tecido adiposo com o sistema nervoso	31
2. Objetivos	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3. Materiais e Métodos	38
3.1 Camundongos	38
3.2 Infecção Gastrointestinal	38
3.3 Delineamento experimental para avaliação da resposta imunológica do tipo 2.	39
3.4 ELISA	40
3.5 Modelo experimental de asma alérgica	40
3.6 Lavado Broncoalveolar (BAL)	41
3.7 Análise Histopatológica	41
3.8 Microscopia Confocal	41
3.9 Processamento tecidual e extração celular	42
3.10 Análise das populações celulares por citometria de fluxo	43
3.12 Análise por UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection)	51
3.13 Análise Estatística	51
4. Resultados e Discussão	52
4.1 Efeito da infecção gastrointestinal sobre a resposta do tipo 2 em diferentes mucosas.	52
4.2 Efeito da infecção por YP sobre a capacidade de indução da resposta Th2 alérgica na mucosa pulmonar.	61
4.3 Interações com componentes colinérgicos no mesentério e sua comunicação com as células imunes pós-infecção.	67
4.3.1 Caracterização de leucócitos presentes no mesentério em animais ChAT-Reporter previamente infectados por YP, e o impacto sobre a expressão do receptor ST2.	67
4.3.2 Avaliação da expressão da enzima ChAT em leucócitos no mesentério pós-infecção por YP.	77
4.4 Efeito da infecção sobre a produção da IL-33 pelas células estromais do mesentério e células epiteliais intestinais.	87
5. Conclusões	92
6. Referências Bibliográficas	94

1. Introdução

1.1 - Componentes imunológicos e microbiota na mucosa intestinal

Os tecidos de mucosa possuem um sistema imunológico especializado que abriga mecanismos imunomoduladores designados a responder uma variedade de desafios para que assegure a integridade tecidual. Dentre todos os tecidos da mucosa, o intestino é um órgão que possui uma grande quantidade de células linfóides distribuídas em uma quantidade comparável ao número de linfócitos contidos em todos os órgãos linfóides secundários resultando no maior compartimento imune do corpo (REZENDE; WEINER, 2017). Para que haja equilíbrio entre as interações com estímulos externos, o sistema imunológico presente na mucosa intestinal atua juntamente com os componentes da microbiota residente, promovendo uma comunicação benéfica. Esta relação é importante para a manutenção das respostas fisiológicas do tecido, e processos relacionados a tolerância e imunovigilância (REZENDE; WEINER, 2017; MOWAT; AGACE, 2014; MAKKI *et al.*, 2018; BÄCKHED *et al.*, 2015; QIN *et al.*, 2010).

O microbioma intestinal, em condições saudáveis, possui uma diversa quantidade de filos bacterianos que favorecem o metabolismo de componentes derivados da dieta. Entretanto, vários fatores podem contribuir com alterações, incluindo, amamentação, idade, ingestão de antibióticos/medicações, e alimentação (RUAN *et al.*, 2020). Sua maioria é composta por espécies anaeróbias facultativas, os quais compõem os filos Firmicutes e Bacteroidetes que integram por volta de 90% dos membros, além da presença de Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria (LEY; PETERSON; GORDON, 2006; SCHROEDER; BÄCKHED, 2016). Os produtos microbianos intestinais produzidos, são reconhecidos por células imunes do sistema inato como as células NK (do inglês, *Natural Killer*), ILCs (do inglês, *Innate Lymphoid Cells*) monócitos, macrófagos, células dendríticas DCs (do inglês *Dendritic Cells*), e células epiteliais intestinais. Estas células expressam receptores que identificam padrões moleculares associados a micróbios ou patógenos (MAMPs do inglês, *Microbial-associated Molecular Pattern* ou PAMPs, do inglês *Pathogen-associated Molecular Pattern*) (NEGI *et al.*, 2019), os quais se ligam a receptores de reconhecimento de padrões (PRRs do inglês *Pattern Recognition Receptors*), das famílias do tipo toll-like (TLRs, do inglês, *Toll like receptors*), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receivers (NLRs), Receptores de lectina do tipo C (CLRs, do inglês *C-type Lectin Receptors*), e receptores do tipo RIG-I

(RLRs, do inglês *RIG-like Receptors*) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; RAKOFF-NAHOUM *et al.*, 2004; NEGI *et al.*, 2019).

A interação entre hospedeiro e a microbiota pode ocorrer através da produção de metabólitos pelos microrganismos, que são absorvidos e podem promover efeitos em todo organismo, contribuindo em grande parte com mecanismos anti-inflamatórios. A produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs, do inglês *Short-Chain Fatty Acids*), um dos principais metabólitos bioativos produzidos pela microbiota, também é importante para a fisiologia intestinal (MACFARLANE; MACFARLANE, 2012). Sua produção pode afetar funções celulares, modulando respostas imunes de forma local e sistemicamente, auxiliando na manutenção da integridade intestinal, e contribuindo com a produção de muco, e proteção contra processos inflamatórios (KOH *et al.*, 2016; MACFARLANE; MACFARLANE, 2012; FELLOWS *et al.*, 2018).

Para que a homeostase imunológica funcione normalmente, o trato gastrointestinal depende, primeiramente, de sua anatomia. O intestino possui diferentes segmentos anatômicos cuja composição imunológica irá variar de acordo com a localização e função de cada segmento intestinal. A primeira porção é constituída pelo intestino delgado, que é dividido em outros três segmentos, duodeno, jejuno e íleo. A segunda parte é composta pelo intestino grosso que inicia no cécum, seguido pelo cólon ascendente (proximal), cólon descendente (distal) reto, e canal anal. Ambas as porções possuem tamanhos e diâmetros diferentes. O intestino delgado possui vilosidades longas e finas separadas pelas criptas de Lieberkühn, onde células tronco multipotentes originam diferentes tipos de células epiteliais. Os enterócitos possuem microvilosidades que aumentam a superfície de digestão e absorção de nutrientes provenientes da dieta. No epitélio intestinal, encontram-se também as células de Paneth responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs), células caliciformes secretoras de muco, e as células enteroendócrinas que liberam hormônios peptídicos e regulam a motilidade e o apetite. O intestino grosso possui um epitélio, caracterizado por células achatadas e planas, as quais contribuem pouco para digestão, se concentrando na absorção de água e formação do conteúdo fecal (WORTHINGTON; REIMANN; GRIBBLE, 2018; MOWAT; AGACE, 2014).

No que se refere à composição da microbiota intestinal, quantidade e diversidade de espécies microbianas neste órgão pode variar de acordo com o segmento intestinal. O intestino é a principal fonte de micróbios comensais contendo 10^{14} microrganismos e mais de

500 espécies diferentes. O número de bactérias geralmente aumenta ao longo do trato gastrointestinal (MOWAT; AGACE, 2014).

Para controlar a exposição dessa grande carga antigênica microbiana aos tecidos do hospedeiro, o sistema imunológico da mucosa intestinal atua de maneiras distintas. Primeiramente minimizando o contato direto entre a superfície das células epiteliais e as bactérias intestinais, gerando a compartimentalização dos microrganismos no lúmen intestinal. Esta segregação ocorre através da secreção de glicoproteínas de mucina, pelas células caliciformes, levando a formação de camadas de muco, peptídeos antimicrobianos e secreção de Imunoglobulina A (IgA). Peptídeos como a lectina antibacteriana RegIII γ (do inglês, *Regenerating islet-derived protein III γ*), são expressos pelas células epiteliais sob e através dos receptores TLRs auxiliam na limitação da penetração de bactérias na camada de muco. Deste modo, os microrganismos comensais podem promover sua própria contenção contribuindo com a homeostase do tecido (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012; VAISHNAVA *et al.*, 2011; BELKAID; BOULADOUX; HAND, 2013).

Em relação aos componentes físicos adjacentes à camada de muco, encontram-se as células epiteliais, que formam a segunda camada da barreira física propriamente dita. Os enterócitos são células responsáveis por controlar o transporte de nutrientes, eletrólitos, fármacos e metabólitos derivados da microbiota, regulando a homeostase intestinal. O transporte passivo através destas células raramente ocorre e, por isso, a função das junções epiteliais entre estas células é importante para manter a integridade da barreira. As *tight junctions* conectam as células epiteliais pela porção apical por meio de um complexo de proteínas transmembrana. Além de regular a passagem de água e solutos, as *tight junctions* exercem também um papel importante na defesa do hospedeiro ao impedir a entrada de patógenos e toxinas (ZIHNI *et al.*, 2016). A junção destes componentes promove a manutenção das barreiras físicas e químicas intestinais, auxiliando na produção de moléculas microbicidas pelas células epiteliais. Esses mediadores são produzidos através da sinalização de diversos receptores inatos, além disso, são responsáveis pela regulação da microbiota intestinal e liberação de metabólitos anti-inflamatórios (VERNOCCHI; DEL CHIERICO; PUTIGNANI, 2020; MOWAT; AGACE, 2014).

No epitélio intestinal a grande maioria das células imunes são linfócitos e são referidos como linfócitos intraepiteliais IELs (do inglês, *intraepithelial lymphocytes*). Estas células são responsáveis por patrulhar o tecido, podendo ser ativadas e gerar respostas inflamatórias,

quando em contato com infecções e estressores (MCDONALD; JABRI; BENDELAC, 2018; OLIVARES-VILLAGÓMEZ; VAN KAER, 2018; BILATE *et al.*, 2020). Os IELs possuem um homodímero de CD8 α (CD8 $\alpha\alpha$), além de receptores de quimiocinas como CCR9 (do inglês, *CC motif chemokine receptor 9*), que se liga a CCL25 (do inglês, *CC motif chemokine ligand 25*) produzida pelos enterócitos. Estas células também expressam a integrina $\alpha 4\beta 7$ (CD103), e interagem com a E-caderina tendo importantes funções no recrutamento de outros linfócitos intraepiteliais, auxiliando na integridade tecidual (VAN OERS *et al.*, 1993; OLIVARES-VILLAGÓMEZ; VAN KAER, 2018; MCDONALD; JABRI; BENDELAC, 2018).

As células T $\gamma\delta$ são encontradas principalmente nos locais de barreira como os intestinos, sendo consideradas linfócitos não convencionais, devido a expressão de seu receptor específico (TCR $\gamma\delta$). Estas células possuem importante papel na fisiologia local e regulação da inflamação, e normalmente reconhecem moléculas relacionadas a estresse e infecções, sendo importantes para produção de interleucina-17 (IL-17) (PAPOTTO; YILMAZ; SILVA-SANTOS, 2021). Além disso, a estimulação com citocinas como interleucina-23 (IL-23), interleucina-1 β (IL-1 β), presentes no microambiente, e interação com a microbiota, promovem a expressão do fator de transcrição ROR- γ t (do inglês, *RAR-related orphan receptor gamma*), e produção de interleucina-22 (IL-22) pelas células T $\gamma\delta$ na lâmina própria, auxiliando no reforço da barreira (DUPRAZ *et al.*, 2021; MILLS, 2023).

Além dos componentes do epitélio, outras células do sistema imunológico também estão presentes na mucosa intestinal. Este compartimento abriga uma grande população de linfócitos B produtores de IgA. Este anticorpo é o principal isotipo produzido na lâmina própria intestinal, atuando na neutralização de patógenos e componentes da microbiota, impedindo sua translocação para a lâmina própria (ZOUALI, 2021; LI *et al.*, 2020). A IgA secretada no lúmen intestinal é formada por dímeros pela interação da cadeia de junção (J), e por seu receptor polimérico de imunoglobulina (pIgR) (WEI *et al.*, 2011). Algumas células, como as DCs, reconhecem microrganismos ligados a IgA sendo importantes para estabelecer o *priming* de linfócitos T naíve e para *switch* de classe de linfócitos B para IgA (WEI *et al.*, 2011; FLEMING; CASTRO-DOPICO; CLATWORTHY, 2022; REBOLDI *et al.*, 2016)

As DCs são consideradas células apresentadoras de antígenos profissionais APCs (do inglês, *Professional antigen presenting cells*), e possuem um importante papel na indução de linfócitos T e B no intestino. Elas podem estar localizadas próxima ao epitélio intestinal, e

emitir pseudópodes para o lúmen para a captura de antígenos, que são apresentados aos linfócitos T e B. Sendo para os linfócitos B de modo T-independente, e T-dependente através da secreção das citocinas BAFF (do inglês, *B cell activating factor*) e APRIL (do inglês, *A proliferation-inducing ligand*), e também na presença de ácido retinóico e TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*). Isto promove o “*gut homing*” das células pela expressão da integrina $\alpha 4\beta 7$, que se liga a E-caderina, auxiliando no processo de adesão celular. Além disso, as DCs são eficientes em induzir a expressão CCR9 nas células T, as quais se ligam à quimiocina CCL25, facilitando sua entrada na lâmina própria. A apresentação dos antígenos que atingem a mucosa intestinal é realizada nas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos MLNs (do inglês, *Mesenteric lymph nodes*), e folículos linfóides isolados (MACPHERSON; SLACK, 2007; BELKAID; BOULADOUX; HAND, 2013; ZOUALI, 2021; SPENCER; SOLLID, 2016; DENUCCI *et al.*, 2010).

A caracterização das DCs intestinais é realizada por clusters de diferenciação CD (do inglês, *Differentiation clusters*), dados pela expressão de moléculas de superfície CD11b e CD103, os quais podem ser divididos em: CD103⁺CD11b⁻; CD103⁻CD11b⁺ e CD103⁺CD11b⁺ (CADER; KASER, 2013; BEKIARIS; PERSSON; AGACE, 2014; HAND *et al.*, 2012). Essas células conseguem sair da lâmina própria e alcançar os linfonodos drenantes, através dos vasos linfáticos mesentéricos (MILLING; JENKINS; MACPHERSON, 2006; DENNING *et al.*, 2007). É importante ressaltar a função do subtipo CD103⁺CD11b⁺, sendo este exclusivamente encontrado na lâmina própria e nos MLNs os quais podem ativar células T auxiliares (Th, do inglês *T helper*) que são importantes para a integridade intestinal, como os linfócitos T reguladores (Tregs) e Th17 (PERSSON *et al.*, 2013; SCHLITZER *et al.*, 2013; COOMBES *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007).

A lâmina própria do intestino delgado contém linfócitos Th17 que são células envolvidas na resposta canônica desta mucosa, as quais possuem potencial imunomodulador em condições de homeostase. Bactérias comensais como a SFB (do inglês, *segmented filamentous bacteria*), fazem parte do estímulo para indução de células Th17 devido a sua adesão às células epiteliais intestinais (IVANOV *et al.*, 2008; GABORIAU-ROUTHIAU *et al.*, 2009). A liberação de IL-17, por estas células, auxilia na produção de peptídeos antimicrobianos, mantendo a função de barreira, em conjunto da liberação de IL-22 (ATARASHI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2020).

Em paralelo, as Tregs são responsáveis pela inibição das respostas de linfócitos efetores e prevenção de respostas não apropriadas contra componentes inócuos da dieta ou da microbiota comensal. Elas constituem uma parcela significativa da população de células TCD4⁺ encontradas na lâmina própria, abrangendo 20% das células no intestino delgado, e até 30% na porção do cólon (ATARASHI *et al.*, 2015). Estas células, expressam o fator de transcrição FOXP3 (do inglês, *forkhead box P3*) e as moléculas de superfície CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) e ICOS (do inglês, *inducible T cell co-stimulator*) e são estimuladas a liberar interleucina-10 (IL-10) e TGF- β (MUCIDA *et al.*, 2007; ATARASHI *et al.*, 2015).

Neste contexto, os linfócitos Tregs são essenciais para a manutenção da tolerância oral nas mucosas. A tolerância oral é um processo canônico da mucosa intestinal e pode ser definido como o estado de ausência de resposta imune local e sistêmica, que é induzida pela administração oral de antígenos proteicos, como por exemplo proteínas alimentares, alérgenos ou até mesmo auto-antígenos (MUCIDA *et al.*, 2007; RUBTSOV *et al.*, 2008; ROUND; MAZMANIAN, 2010). A indução das Tregs na mucosa intestinal é favorecida por vários fatores que vão desde a alta capacidade deste tecido, particularmente das células dendríticas residentes, em metabolizar vitamina A em ácido retinóico (essencial para a indução de Tregs); alta produção local de TGF- β , presença de metabólitos da microbiota, como determinados ácidos graxos de cadeia curta. Deste modo, as Tregs controlam os mecanismos de tolerância oral e são fundamentais para a contenção das respostas inflamatórias exacerbadas promovidas por células efectoras (PABST; MOWAT, 2012; SATITSUKSANOVA *et al.*, 2018; COMMINS, 2015).

1.2 - O impacto das infecções gastrointestinais na mucosa intestinal

Embora a resiliência da microbiota seja importante para manter a homeostase e nos proteger de doenças, seu desequilíbrio, conhecido como disbiose, pode acarretar em uma variedade de anormalidades, como inflamação e estresse oxidativo, impactando negativamente nas condições fisiopatológicas do hospedeiro (NOGAL; VALDES; MENNI, 2021; SOMMER *et al.*, 2017).

No trato gastrointestinal, as infecções agudas que acometem a mucosa podem desencadear processos de disbiose. Estas infecções também estão relacionadas com a presença significativa de bactérias que possuem propriedades invasivas que podem exacerbar diretamente a inflamação, e levar a danos teciduais (LUPP *et al.*, 2007). As infecções

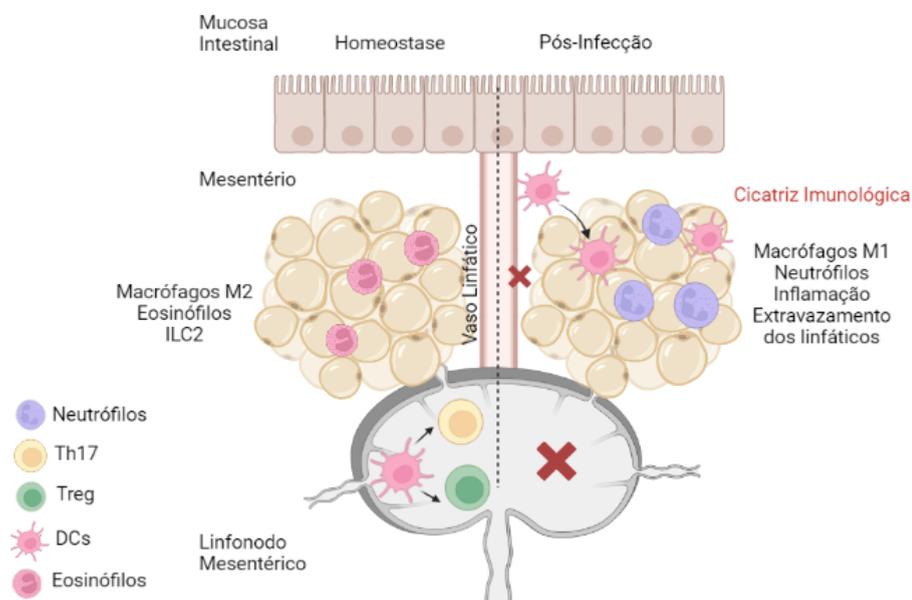
gastrointestinais podem resultar em quebra da barreira imunológica intestinal e aumento da permeabilidade, o que pode desencadear a translocação da microbiota intestinal para a lâmina própria e até mesmo alcançar outros tecidos do corpo, desencadeando um processo de inflamação crônica (BELKAID; HAND, 2014).

No decorrer da progressão de doenças infecciosas, a tolerância aos micróbios comensais pode ser perdida. Se isso ocorrer, é possível que haja ativação de respostas específicas de células T direcionadas contra a microbiota comensal. A diferenciação em células efetoras inflamatórias pode gerar células de memória que são funcionalmente semelhantes às destinadas a patógenos. Desta forma a resposta imune aos comensais ocorre de forma conjunta aos microrganismos invasores (HAND *et al.*, 2012).

De fato, é descrito na literatura que, em um modelo murino de infecção gastrointestinal por *Toxoplasma gondii*, a diversidade da microbiota comensal é reduzida em quantidade de espécies, sendo acompanhado por supercrescimento de espécies invasivas que se translocam para os linfonodos mesentéricos, baço e fígado dos animais. Também foi constatado que houve o aumento de bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Prevotella spp*, em altas concentrações no íleo inflamado dos animais (HEIMESAAT *et al.*, 2006). Em outro estudo com um modelo murino de infecção por *E. coli* enterohemorrágica EHEC (do inglês, *Enterohemorrhagic Escherichia coli*), foi descoberto que a bactéria comensal denominada *Bacteroides thetaiotaomicron* é capaz de aumentar a virulência e a patologia da doença causada pela EHEC. Outros patógenos, como a bactéria *Citrobacter rodentium* em modelo murino, também foram descritos por sua capacidade de aumento da permeabilidade intestinal pós-infecção. Isto indica que os componentes da microbiota e os microrganismos patogênicos podem impactar uns aos outros e também o hospedeiro, causando consequências que podem gerar a progressão da resposta inflamatória e causar a perda da homeostase intestinal (CURTIS *et al.*, 2014). Em conjunto a esses dados, a infecção pela bactéria enteropatogênica *Yersinia pseudotuberculosis* promove o rompimento da barreira intestinal e consegue invadir seu hospedeiro pelo tecido linfóide associado às placas de Peyer, causando enterite e linfadenopatia mesentérica (MEINZER *et al.*, 2012).

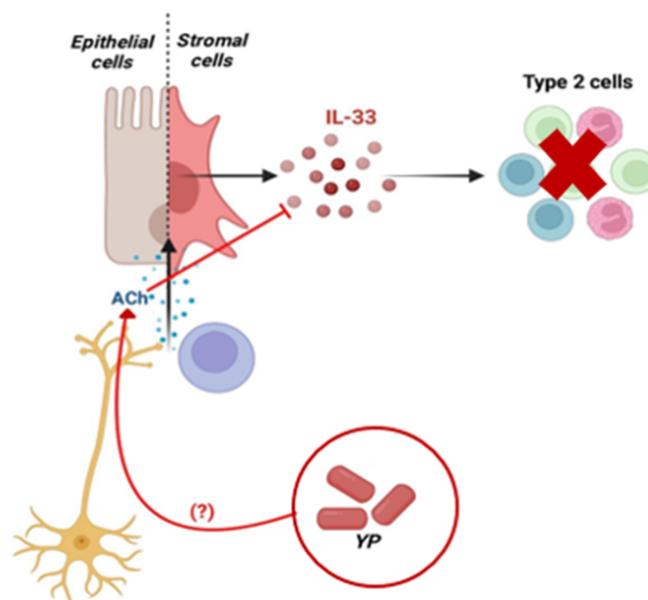
Neste contexto, nosso grupo demonstrou que um único episódio de infecção gastrointestinal aguda por *Y. pseudotuberculosis*, patógeno entérico, foi capaz de ocasionar um processo denominado por nosso grupo de **cicatriz imunológica** (Esquema 1) que consiste na perda da capacidade de induzir respostas imunológicas canônicas no intestino. Mesmo

após sua eliminação do organismo do animal, foi possível notar a translocação da microbiota intestinal para o mesentério, associada a uma inflamação crônica deste tecido. Em virtude desta inflamação crônica houve um aumento da permeabilidade dos vasos linfáticos mesentéricos, o que compromete a migração das DCs intestinais, em especial a população $CD11b^+ CD103^+$, para os linfonodos mesentéricos. Como consequência desse desvio, estas células se deslocaram para o mesentério. Por conta desse processo, as respostas canônicas ativadas na mucosa intestinal pelas DCs, tornam-se comprometidas, restringindo a diferenciação de células Th17 e Tregs e dificultando a produção de anticorpos da classe IgA. A falha destas respostas associadas a perda da compartimentalização da microbiota intestinal, e sua translocação para o mesentério, mantém um processo de inflamação crônica neste tecido. Em paralelo a este processo, também observamos que há um prejuízo da resposta imune do tipo 2 no tecido adiposo mesentérico pós-infecção (FONSECA *et al.*, 2015). Em outro trabalho desenvolvido por nosso grupo, verificamos que os animais que passaram pela infecção e desenvolvem a cicatriz imunológica são resistentes à indução de novas célula Th2 no mesentério, mesmo mediante a imunização com formulações de antígeno e adjuvante que sabidamente favorecem a polarização de respostas Th2 (Pizzolante & Moreira *et al*, dados não publicados).



Esquema 1– Cicatriz imunológica. A infecção gastrointestinal causada por YP, pode levar a um remodelamento permanente do tecido linfóide e o extravasamento dos vasos linfáticos, e consequente infiltração de células mielóides, causando uma inflamação crônica no mesentério onde há aumento da inflamação do tipo 1 e diminuição da resposta do tipo 2 e das respostas reguladoras. Como resultado as DCs, principalmente o subtipo $CD11b^+CD103^+$ se tornam incapazes de migrar para os linfonodos mesentéricos e induzir respostas canônicas na mucosa intestinal.

Neste contexto, e de maneira relevante para a compreensão do presente trabalho, em outro trabalho realizado por nosso grupo, demonstrou-se que camundongos naives transgênicos VACht knock down (KD), (do inglês, *vesicular acetylcholine transporter*), os quais possuem redução na expressão da vesícula transportadora de acetilcolina para a fenda neuronal, resultando na diminuição da sinalização colinérgica em todos os locais do organismo, foram tratados farmacologicamente com mecamilamina ou vagotomizados (VgX) possuem um enriquecimento significativo no infiltrado de células e citocinas do perfil de resposta do tipo 2 (Th2, ILC2 e eosinófilos). Este processo foi observado de forma mais clara no mesentério, mas não em outros tecidos adiposos. Além disso, a acetilcolina parece suprimir e, sua ausência parece regular positivamente a produção de interleucina-33 (IL-33) por células do estroma mesentérico e aumentar a população de eosinófilos neste tecido (MENEZES-SILVA *et al.*, em submissão). Isto nos levou a hipotetizar, no presente trabalho, que a infecção por YP poderia alterar mecanismos de regulação imunológica neural neste tecido adiposo, comprometendo assim a capacidade de indução de respostas do tipo 2 pós-infecção e desenvolvimento de cicatriz imunológica (Esquema 2).



Esquema 2– Imagem demonstrativa da hipótese. Baseado em dados anteriores de nosso grupo, os quais mostram que a produção de acetilcolina parece suprimir a liberação de IL-33 pelas células estromais do mesentério e consequentemente diminuir a resposta imune do tipo 2, neste trabalho, hipotetizamos que a infecção por YP poderia promover a liberação de acetilcolina no mesentério e afetar a produção de IL-33, consequentemente bloqueando o tônus imunológico do tipo 2.

1.3 - O tecido adiposo e suas funções fisiológicas e imunológicas

Os tecidos adiposos em geral possuem como função promover a reserva lipídica e armazenamento de energia. Além disso, contribuem para a sustentação de órgãos, controle da temperatura corporal, atuando no controle de produção de hormônios relacionados à fome e suporte na chegada de vasos e nervos aos órgãos destino (TRAYHURN; BEATTIE, 2001). O tecido adiposo é formado pelos adipócitos, que são as células responsáveis por armazenar ácidos graxos no organismo e gerar energia, e células da fração estromal: fibroblásticas, mesoteliais, células da vasculatura, sistema imune e tecido nervoso (KERSHAW; FLIER, 2004).

Um importante componente da fração estromal inclui células tronco derivadas do tecido adiposo ADSCs (do inglês, *Adipose-derived stem cells*), fibroblastos, pré-adipócitos, células endoteliais, células mesoteliais, entre outros componentes (BOURIN *et al.*, 2013; BORA; MAJUMDAR, 2017). A fração vascular estromal SVF (do inglês, *Stromal vascular fraction*), é caracterizada por uma população mais heterogênea de células mesenquimais (NGUYEN *et al.*, 2016).

Em um estudo, a análise de expressão gênica de adipócitos e da SVF por qRT-PCR revelou que houve alta expressão de IL-33 na SVF, particularmente em células não hematopoiéticas (CD45⁻). Além disso, a análise por citometria de fluxo mostrou uma expressão predominante desta citocina nas células da SVF (MAHLAKÖIV *et al.*, 2019). A produção de IL-33 pelas células estromais desempenha um papel importante para manutenção do tônus imunológico no tecido adiposo. As ADSCs produtoras de IL-33 podem atuar impulsionando a proliferação de células Tregs CD4⁺FOXP3⁺ST2⁺ e ILC2, regulando tanto a resposta adaptativa quanto a inata (LIU *et al.*, 2021; MAHLAKÖIV *et al.*, 2019).

Ainda neste contexto, a infecção intestinal causada pelo helminto *Heligmosomoides polygyrus*, induziu o acúmulo de células estromais produtoras de IL-33 e linfopoetina estromal tímica TSLP (do inglês, *Thymic stromal lymphopoietin*), promovendo o recrutamento de células Th2 residentes no mesentério. Estas células estromais foram associadas com a expressão de genes relacionados a células progenitoras multipotentes MPC (do inglês, *Multipotent progenitor cells*), que são capazes de se diferenciar em fibroblastos e adipócitos (KABAT *et al.*, 2022). As células estromais multipotentes MSCs (do inglês, *Multipotent stromal cells*) do tecido adiposo atuam como grandes produtoras de Eotaxina - CCL11 (do inglês *C-C Motif Chemokine Ligand 11*), que atua no recrutamento de eosinófilos,

ajudando a sustentar o microambiente imunológico do tipo 2, e sua comunicação com as outras células (RANA *et al.*, 2019).

Além da importante produção da IL-33 para integridade do tecido adiposo e sua manutenção, outras células e mediadores produzidos localmente podem auxiliar recrutando células do sistema imunológico para o tecido (CHUNG *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2021). Por exemplo, os macrófagos “M2” alternativamente ativados, são polarizados pela liberação de citocinas como IL-4, IL-13 e IL-10, que são produzidos pelos linfócitos Tregs, Th2 GATA3⁺ (do inglês *Gata binding protein 3*) e pelas ILC2, garantido este fenótipo no tecido. Estas células são caracterizadas pela alta expressão dos marcadores, arginase-1, CD206 [Mrc1] ou CD301 [Clec10a] (VILLARROYA *et al.*, 2018).

Em paralelo, as células T e B nos tecidos adiposos viscerais, podem se organizar em *clusters* linfóides associados a gordura FALCs (do inglês *Fatty associated lymphoid clusters*); e são comumente identificados no mesentério de camundongos e humanos. Ao contrário dos órgãos linfóides secundários, os FALCs não possuem cápsulas estando em contato direto com os adipócitos do tecido, e se assemelham a órgãos linfóides terciários. Nos FALCs presentes no tecido adiposo mesentérico, ou mesentério, são encontrados clusters de células B B220⁺ com número variado de células TCD4⁺ e células mielóides CD11b⁺. Também são encontradas células ILC2, que auxiliam na indução de células B1, através da produção de IL-5 e da quimiocina CXCL13 (do inglês, *C-X-C motif ligand 13*) pelas células estromais. Além disso, os FALCs são altamente vascularizados propiciando comunicação com os vasos sanguíneos (CRUZ-MIGONI; CAAMAÑO, 2016; MORO *et al.*, 2010; BÉNÉZECH *et al.*, 2015). Apesar de pouco se conhecer sobre a relação dos FALCs com os vasos linfáticos, foi demonstrado que infecções gastrointestinais agudas são capazes de promover a linfangiogênese em FALCs presentes no mesentério (FONSECA *et al.*; 2015).

As ILCs, assim como as células TCD4⁺ no tecido adiposo, são consideradas importantes para o recrutamento celular e *homing*. As ILCs do tipo 2 são identificadas pela expressão do fator de transcrição GATA3. Assim como as células Th2, as ILC2 produzem altos níveis de IL-5, IL-13, IL-4, como descrito anteriormente, bem como podem expressar os receptores de IL-33, IL-25 e KLRG1 (do inglês *killer cell lectin receptor G1*), (marcador de diferenciação das ILC2), podendo responder aos estímulos a essas citocinas e atraindo a população de eosinófilos para o tecido (EBERL *et al.*, 2015; TAYLOR *et al.*, 2017).

1.4- Mesentério como um novo órgão e componente da barreira imunológica intestinal

Classificado como um novo órgão em 2016, o mesentério é um depósito de gordura visceral sendo predominantemente composto por células do tecido adiposo branco. Localizado na dobra do peritônio, anatomicamente ele se fixa as alças intestinais na cavidade peritoneal promovendo seu suporte (COFFEY *et al.*, 2020; TCHKONIA *et al.*, 2013). Assim como a maioria dos tecidos adiposos, o mesentério em contexto fisiológico é composto por células imunes do tipo 2, onde também são encontrados inúmeros FALCs (BÉNÉZECH; JACKSON-JONES, 2019). Além disso, o mesentério desempenha uma função importante na defesa contra antígenos invasores, promovendo a contenção da translocação bacteriana, pela produção de citocinas anti-inflamatórias. Quando essa barreira é quebrada, a invasão das bactérias no lúmen intestinal faz com que o tecido gere uma resposta inflamatória, aumentando a produção de citocinas como IL-6, IL-1 β e IL-17. Esse tipo de condição está associada a diversas patologias como por exemplo a Doença de Crohn, onde pode-se notar um aumento proeminente da gordura mesentérica ao redor dos intestinos, denominada “*creeping fat*” (gordura-rastejante) (BATRA *et al.*, 2012; ZWICK *et al.*, 2018). De fato, após a infecção com YP observamos um aumento crônico na inflamação desse tecido, devido à cicatriz imunológica. Este aumento também é observado no intestino, onde os animais se tornam mais suscetíveis a desenvolverem colite (Mandu-Gonçalves *et al.*, dados não publicados).

1.5 - Comunicações do tecido adiposo com o sistema nervoso

O tecido adiposo é capaz de produzir adipocinas, que regulam funções neuroendócrinas, as quais podem ser reconhecidas no sistema nervoso central (SNC). Neste local são encontrados receptores para esses fatores, gerando assim um mecanismo de retroalimentação na produção de hormônios ou de neurotransmissores, que contribuem para seu controle homeostático (BEALL; HANNA; ELLACOTT, 2017; PARIMISSETTY *et al.*, 2016). Além disso, a presença do nervo vago pode contribuir com o controle das funções fisiológicas promovidas pelo tecido adiposo visceral. Isto ocorre especialmente por estes tecidos servirem de caminho para inervação das vísceras abdominais e torácicas, como o intestino (COFFEY; WALSH, 2020). O mesentério é um exemplo desses tecidos, no qual são encontradas fibras nervosas autônomas que conectam os gânglios espinhais ao intestino, podendo promover a comunicação entre o sistema nervoso e a gordura mesentérica (TCHKONIA *et al.*, 2013).

Apesar da importante função do SNC para o controle e homeostase das funções neuroendócrinas, é no sistema nervoso periférico que se encontram as atividades mais importantes nesse contexto. Estas ações são mediadas através do sistema nervoso autônomo (SNA), em conjunto com atuação do sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP) promovendo a comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso (BARTNESS *et al.*, 2014).

O sistema nervoso autônomo possui ampla inervação que é alcançada em quase todos os sistemas do corpo, incluindo o tecido adiposo. É conhecido por controlar funções de “luta ou fuga”, e de “digestão e descanso” atuando sobre as ações involuntárias do organismo (GIBBONS, 2019; FURNESS, 2006; MORIYAMA; ARTIS, 2019). A atividade desse sistema ocorre através de neurônios centrais, os quais respondem estímulos enviados pelas vias aferentes e modulam atividades autonômicas eferentes, que são geradas de forma apropriada de acordo com as necessidades do organismo (SHIELDS, 1993). Os componentes periféricos do sistema nervoso autônomo se caracterizam por fibras pré e pós-ganglionares, e o local onde esses se comunicam é denominado de gânglio. Em geral, as fibras pré-ganglionares do sistema nervoso simpático periférico são curtas, enquanto as fibras pós-ganglionares são longas. Em contrapartida, a via parassimpática possui as fibras pré-ganglionares mais longas, e as pós-ganglionares mais curtas. As respostas autônomas dos sistemas simpático e parassimpático atuam de maneira antagônica e sinérgica, no controle harmônico da atividade visceral sendo coordenadas pelo SNC (GIBBONS, 2019; WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016).

O principal neurotransmissor encontrado no sistema nervoso periférico é a acetilcolina (ACh), que atua tanto sobre o sistema nervoso simpático quanto no parassimpático, realizando a sinapse na região de encontro dos gânglios. No SNS as fibras pré-ganglionares atuam liberando ACh. A diferença entre ambos ocorre quando há liberação do neurotransmissor nos neurônios pós-ganglionares. No SNS isto resulta na liberação dos neurotransmissores noradrenalina (NA) e adrenalina (Adr). Nos tecidos, as células alvo devem possuir receptores de natureza adrenérgica, que reconhecem essa sinalização para promover suas funções (WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016). No tecido adiposo a liberação de noradrenalina (NA), é importante para a termogênese e lipólise do tecido (BLASZKIEWICZ *et al.*, 2019).

As vias parassimpáticas atuam da mesma forma que as simpáticas, o que difere é a liberação de ACh como neurotransmissor pelas fibras pós-ganglionares. Contudo, no tecido,

as células devem expressar receptores muscarínicos e nicotínicos para promover a comunicação (WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016; COX *et al.*, 2020). Essa dupla sinalização é responsável por inúmeras funções vitais do organismo, como regulação da frequência cardíaca, broncodilatação ou broncoconstrição, peristaltismo, controle da musculatura lisa e esfíncteres, entre outras (WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016). Entretanto, em relação ao sistema nervoso parassimpático, pouco ainda é conhecido sobre a participação de sua via sobre o controle das respostas imunológicas no tecido adiposo (BARTNESS *et al.*, 2010; GIORDANO *et al.*, 2006; KREIER; BUIJS, 2007).

A acetilcolina é um dos neurotransmissores mais abundantes encontrados no organismo humano. Identificada em 1914 pelo cientista Henry Hallett Dale, (DALE, 1914), e posteriormente por Otto Loewi (TANSEY, 2006), este neurotransmissor é sintetizado pela enzima ChAT (do inglês, *Choline acetyltransferase*) a partir dos compostos colina e acetil-CoA, sendo secretado em resposta aos estímulos neuronais enviados pelo sistema nervoso central ou periférico (CHU *et al.*, 2021). Deste modo, pode atuar em diversas funções hormonais como no controle da vasodilatação e broncoconstrição. Ao ser liberado na fenda sináptica, promove ativação de seus receptores nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChRs), devido sua atividade agonista (SURYANARAYANAN, 2014; ZDANOWSKI *et al.*, 2015). A sinalização pela ACh é mediada pelos receptores nicotínicos (nAChRs), e muscarínicos (mAChRs). Os receptores nicotínicos são canais catiônicos controlados por ligantes, enquanto os muscarínicos são acoplados à proteína G. A estrutura dos receptores nicotínicos é composta por pelo menos duas cadeias α , das quais existem 9 ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), formando heteropentâmeros, e podem incluir cadeias β , as quais existem 4 ($\beta 1$ - $\beta 4$). Já os receptores muscarínicos podem ser encontrados em 5 tipos diferentes (M1-M5) (COX *et al.*, 2020).

Atualmente há um grande interesse pela compreensão da comunicação entre os componentes do sistema nervoso e do sistema imunológico. Essa interação ocorre por meio de mediadores produzidos por ambos, como por exemplo por neurotransmissores liberados pelos neurônios e citocinas liberadas pelos leucócitos. Diversos tipos de células imunes são capazes de expressar receptores para grande parte dos neurotransmissores, sendo esses de origem adrenérgica ou colinérgica. Estes são expressos na superfície de macrófagos, DCs, linfócitos B e T e células NK, e são capazes de regular a produção de citocinas. Além disso, os neurônios também podem expressar receptores para citocinas e PRRs incluindo receptores do

tipo toll e RIG (FUJII; KAWASHIMA, 2000; TRACEY, 2002; LIU *et al.*, 2014; MATHEIS *et al.*, 2020).

Neste contexto, os receptores de acetilcolina (AChR) também podem ser expressos pelas células imunes. A expressão de AChR nas células do sistema imunológico foi avaliada em camundongos C57BL/6 em níveis transcriptômicos, na qual foi mostrado que há uma maior expressão desses receptores em linfócitos, do que por exemplo, em células dendríticas (QIAN *et al.*, 2011). Na população de linfócitos naives TCD4⁺ e TCD8⁺ as cadeias β 1 e β 2 dos receptores nicotínicos foram as mais expressas em níveis de mRNA. Contudo, quando há ativação das células TCD4⁺, a presença destes receptores pode variar de acordo com seu perfil. Em células com perfil Th2 foi observado uma maior indução de α 4, quando comparado com células polarizadas em Th1 e Th17. Em relação aos receptores muscarínicos, em células T naives, notou-se que houve um aumento da expressão de M3 e M4. Quando essas células sofreram ativação *in vitro*, níveis maiores da expressão receptor M1 foram encontrados. Nas células já ativadas a polarização em Th2 aumentou a expressão de M1 e M5, e em Th1 foi observado grande expressão de M4 (COX *et al.*, 2020; QIAN *et al.*, 2011).

Além da presença dos receptores de ACh nas células do sistema imune, é conhecido que esses componentes também podem produzir ACh. Assim como nos neurônios, as células não neuronais sintetizam ACh através de sua catalisação pela enzima ChAT. Essa produção não neuronal medeia suas ações celulares de forma autócrina e parácrina por meio da ativação de seus receptores, que são capazes interferir em diversas vias de sinalização celular (WESSLER; KIRKPATRICK; RACKÉ, 1999; BECKMANN; LIPS, 2013).

Diversos trabalhos na literatura apontam como esta comunicação é importante no controle das funções neuro-imunomodulatórias. Em 1993, Kawashima et al, mostraram que a ACh presente no sangue humano era produzida principalmente por leucócitos mononucleares (KAWASHIMA *et al.*; 1993), e mais tarde que a expressão de ChAT também é encontrada em células dendríticas, macrófagos e mastócitos, sendo predominante em linfócitos TCD4⁺ (KAWASHIMA *et al.*, 2012; BECKMANN; LIPS, 2013).

A liberação de ACh pelas células imunes pode ocorrer de forma diferente que em células neuronais. *In vitro* a liberação de ACh pelos linfócitos TCD4⁺ de camundongos é induzida quando os receptores β 2 adrenérgicos (β 2AR), são ativados pela interação com a noradrenalina (ROSAS-BALLINA *et al.*, 2011). *In vivo*, foi descrito que essa via permite conexões pelas quais o sistema nervoso pode influenciar diretamente as células T. Deste

modo, a produção de noradrenalina pelos neurônios age sobre os receptores β 2AR dos linfócitos TCD4 presentes no baço, e estimula a liberação de ACh (FUJII; TAKADA-TAKATORI; KAWASHIMA, 2012). Contudo, em linfócitos B que expressam ChAT estimulados com NA *in vitro*, não foram encontrados níveis detectáveis da produção de ACh (REARDON *et al.*, 2013).

Em relação a ação da acetilcolina em infecções sistêmicas, em meados dos anos 2000, Tracey e sua equipe descobriram que a liberação da ACh, e a estimulação vagal, pode proteger animais da sepse induzida por endotoxina-lipopolissacarídeos (LPS). A atenuação da produção das citocinas, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18, foi demonstrada em culturas de macrófagos humanos incubadas com ACh. Em ratos a estimulação direta do nervo vago na periferia *in vivo*, inibiu a síntese de TNF no fígado reduzindo seus níveis séricos prevenindo o desenvolvimento do choque séptico (BOROVIKOVA *et al.*, 2000). Outros dados mostram que a sinalização da acetilcolina sobre o sistema imunológico, ocorre através dos receptores α 7 nicotínicos (nAChRa7), bloqueando a ativação de NF-kB (do inglês, *Nuclear factor kappa B*) e impedindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (TRACEY, 2002; TRACEY, 2005). Além disso, o grupo demonstrou que a fonte da ACh produzida no baço dos camundongos era derivada das células TCD4⁺ que expressavam ChAT (ROSAS-BALLINA *et al.*, 2011). Com isso a interação da sinalização colinérgica e o sistema imune se tornou conhecida por arco reflexo inflamatório, tendo importante função no controle da sepse, sendo denominado “via anti-inflamatória colinérgica” (TRACEY, 2002; ROSAS-BALLINA *et al.*, 2011; COX *et al.*, 2020).

Outras populações de células como as ILCs, principalmente as do tipo 2, parecem ter um papel importante na produção de ACh durante processos infecciosos na mucosa. Dessa forma as ILCs atuam como mediadores críticos para manter a homeostase tecidual (MORIYAMA; ARTIS, 2019). Neste contexto, em modelo murino foi demonstrado que nos pulmões, as ILC2 em estado ativado, podem desenvolver um fenótipo colinérgico, e promover a síntese e liberação de ACh durante a infecção por nematóides parasitários. Este fenótipo pode ser induzido pela exposição *in vivo* a extratos fúngicos de *Alternaria alternata* e em contato com as citocinas IL-33 e IL-25 *in vitro*, consideradas importantes alarminas para o controle de infecções parasitárias e potentes estimuladores da resposta do tipo 2. O bloqueio da síntese de ACh nas ILC2, contribuiu para o aumento da carga parasitária nos intestinos e nos pulmões, prejudicando a imunidade de barreira (ROBERTS *et al.*, 2021). Além disto, durante a infecção helmíntica por *Nippostrongylus brasiliensis* as ILC2 regularam

positivamente a expressão da enzima ChAT. O tratamento com as alarminas IL-33, IL-25 e com TLSP, neste estudo, corroborou com esse fenômeno através do estímulo e produção da ACh. A administração da ACh tanto *in vivo*, quanto *in vitro* promoveu a liberação de citocinas como IL-5, e IL-13 ativando os receptores colinérgicos presentes nas ILC2, e aumentou o número de eosinófilos, auxiliando na expulsão dos helmintos. Ademais a depleção condicional de ChAT nas ILC2, inibiu a produção de citocinas do tipo 2 e desencadeou respostas defeituosas para proteção parasitária. Desta forma a produção de ACh por uma fonte não neuronal demonstra ter um importante papel na promoção da imunidade inata do tipo 2, pela interação via ChAT-ACh em respostas contra infecções helmínticas nas mucosas (CHU *et al.*, 2021).

Sabendo que o mesentério possui grande comunicação com o intestino na promoção de respostas imunes fisiológicas, ainda existem poucos estudos que avaliam o impacto de infecções gastrointestinais agudas na interação entre esses tecidos. A produção de IL-33 pela fração estromal do tecido adiposo é necessária para manter o tônus do tipo 2 no mesentério (MAHLAKÖIV *et al.*, 2019). Além disto, a produção de acetilcolina via neuronal, e também através das células do sistema imune é descrita como importante para modulação de respostas a outros patógenos e em processos alérgicos nos tecidos como os intestinos e pulmões (ROBERTS *et al.*, 2021). Contudo, ainda é desconhecido como esse mecanismo ocorre no mesentério, e como isso atinge de fato o tônus tecidual. Nossos dados mostram que após a infecção por YP existe um bloqueio no tônus imunológico do tipo 2 no mesentério devido a cicatriz imunológica. Considerando que a via colinérgica parece controlar este tônus, nós hipotetizamos que a infecção pela bactéria *Yersinia pseudotuberculosis* poderia promover a secreção de acetilcolina e, portanto, bloquear a produção local de IL-33 inibindo a resposta do tipo 2.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar o impacto da infecção intestinal aguda pela bactéria *Yersinia pseudotuberculosis* sobre o tônus imunológico (tipo 2) no mesentério e mucosas, assim como os mecanismos envolvidos neste fenômeno.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito da infecção gastrointestinal sobre a resposta do tipo 2 em diferentes mucosas;
2. Avaliar o efeito da infecção por YP sobre a capacidade de indução da resposta Th2 alérgica na mucosa pulmonar;
3. Verificar possíveis interações com componentes colinérgicos no mesentério e sua comunicação com as células imunes pós-infecção;
4. Realizar a caracterização de leucócitos presentes no mesentério em animais ChAT-Reporter previamente infectados por YP, e o impacto sobre a expressão do receptor ST2;
5. Avaliar a expressão da enzima ChAT em leucócitos no mesentério pós-infecção por YP;
6. Pesquisar o efeito da infecção sobre a produção de IL-33 pelas células estromais do mesentério e células epiteliais intestinais.

3. Materiais e Métodos

3.1 Camundongos

Os animais da linhagem C57BL/6, fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas ao início dos experimentos, foram obtidos do biotério de criação de animais do Centro de Bioterismo (FM, Rede USP de Biotérios) e mantidos na Instalação Animal Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. Os camundongos IL-33^{-/-} gfp, (homozigotos) que expressam a fluorescência de eGFP (do inglês *Enhanced green fluorescent protein*), no lugar do promotor da proteína IL-33, e os animais IL-33^{+/-} gfp (heterozigotos), que possuem apenas um alelo substituído por eGFP, enquanto o outro permanece funcional, foram utilizados para avaliar e rastrear a atividade da IL-33. Estes animais foram cedidos pelo Prof. José Carlos Farias Alves Filhos, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), os quais foram mantidos no biotério de quarentena do departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. Animais ChAT Cre-Tdtomato com 4 semanas foram fornecidos pelo Prof. José Donato Junior (Departamento de Fisiologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP), e foram mantidos no biotério de quarentena. Estes animais possuem um gene *reporter* RFP (do inglês *Red fluorescent protein*) na região codificante da enzima colina acetiltransferase, apresentando assim fluorescência na faixa de comprimento de onda visível $\approx 550\text{nm}$. Os animais e experimentos foram conduzidos com aprovação e certificação pela CEUA ICB nº 5807220222, e CEUA nº 49/2016 e pelas normas estabelecidas pelo CONCEA. A eutanásia dos animais foi realizada por dosagem excessiva do anestésico isoflurano.

3.2 Infecção Gastrointestinal

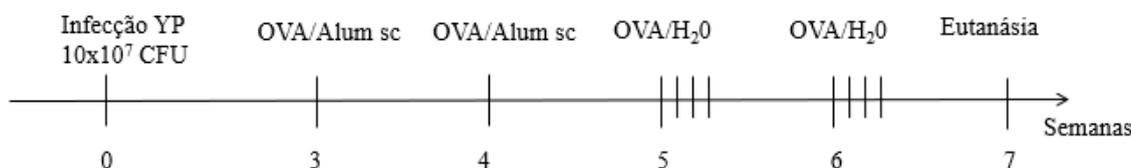
Para a infecção, a bactéria YP (cepa IP32777) foi semeada em meio de cultura ágar MacConkey sem antibiótico e incubada em estufa a 25°C por 48 h. Logo após, uma colônia isolada foi cultivada em meio líquido 2XYT (Becton, Dickinson and Company) a 25°C por 18 h sob agitação de 200 rpm. Após o crescimento, a concentração das bactérias viáveis foi quantificada de acordo com a densidade óptica da cultura (obtida em 600 nm) interpolada em uma curva de crescimento bacteriano previamente padronizada no laboratório. Os camundongos foram mantidos em jejum de 12h antes da infecção, que foi realizada por gavagem de 200 μL de solução salina contendo 1×10^7 Unidades Formadoras de Colônia

(UFC) de YP WT. Os experimentos foram realizados após 4 semanas da infecção, tempo necessário para que haja a eliminação completa da bactéria.

3.3 Delineamento experimental para avaliação da resposta imunológica do tipo 2.

Para avaliar capacidade de indução de respostas do tipo 2 no intestino e mesentério, camundongos fêmeas C57BL/6 naives ou previamente infectados com YP foram imunizados com o antígeno Ova (Sigma - Grau V) associado ao adjuvante hidróxido de alumínio (alum) (Thermo Scientific™), que induz a polarização da resposta Th2. Para tanto, os animais foram imunizados com duas injeções de 200 µL de Ova/alum pela via subcutânea (SC) na região lombar. As injeções foram aplicadas com um intervalo de uma semana. A Ova encontrava-se em estoque na concentração de 100 µg/µL, e cada animal recebeu o equivalente a 100 µg de Ova e 50 µL de alum diluídos em 150 µL da solução de salina injetável estéril. Após a imunização via subcutânea de Ova/alum, com o intuito de direcionar a resposta Th2 para o mesentério ou para a mucosa intestinal foi realizado o desafio com Ova por via oral, onde os animais receberam 1,5% de Ova (Sigma – Grau II) na água de beber durante quatro dias consecutivos, sendo o mesmo procedimento repetido novamente com um intervalo de uma semana. Após 48 horas do término do desafio, o mesentério e o intestino delgado dos animais foram coletados para imunofenotipagem celular por citometria de fluxo.

Protocolo 1 - Ova Oral



Esquema 3- Delineamento experimental para promoção de resposta imunológica do tipo 2 utilizando Ova (Protocolo 1). Camundongos C57BL/6 foram infectados com YP por *gavagem*. Após 3-4 semanas foram imunizados duas vezes pela via subcutânea com Ova/alum, com intervalo de uma semana entre elas. Para o protocolo de desafio via oral, os animais receberam 1,5% de Ova na água de beber por quatro dias consecutivos. Após uma semana o procedimento foi novamente repetido, 48 horas após o último desafio os animais foram eutanasiados.

3.4 ELISA

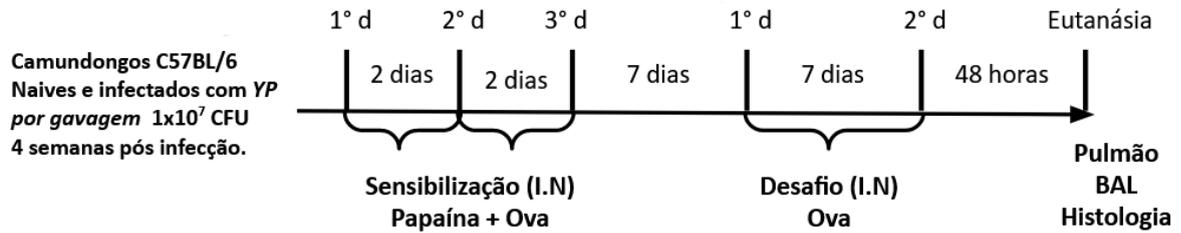
Para a dosagem dos anticorpos IgG1, IgG2a e IgA específicos para OVA no soro dos camundongos, realizamos o ensaio de imunoabsorção enzimática ou ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) seguintes anticorpos: IGg2A - HRP, Clone: R19-15; IgG1- HRP, Clone: X56 e IgA Biotinilado, Clone: CD10-1, todos do fabricante BD Pharmingen, seguindo as recomendações do fabricante.

Para a detecção dos anticorpos no soro, inicialmente foi realizado o *coating* da placa com tampão carbonato de sódio 0,1M (pH = 9,5) e Ova na concentração de 10 µg/mL *overnight* a 4 °C. Posteriormente, os poços foram lavados com o tampão de lavagem PBS (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) +Tween-20 0,05% e bloqueados com solução de bloqueio PBS + Soro Fetal Bovino (SFB) 10% por uma hora em temperatura ambiente. As amostras de soro foram devidamente diluídas e plaqueadas nos poços, seguido de incubação por duas horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com solução de lavagem. Os respectivos anticorpos de detecção foram devidamente diluídos (1:200) em tampão de bloqueio e pipetados nos poços, seguido de incubação por uma hora em temperatura ambiente. Após as placas serem vertidas e os poços lavados, foi pipetada a enzima peroxidase conjugada a estreptavidina e incubou-se por 30 min em temperatura ambiente. Seguimos com a lavagem dos poços e adição de solução de tetrametilbenzidina (TMB, BD™) por 30 min em temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente foi feita a parada da reação com o uso de ácido sulfúrico 2M (LGC Biotecnologia) e a leitura das placas foi realizada a 450 nm.

3.5 Modelo experimental de asma alérgica

Camundongos previamente infectados ou não com YP foram submetidos ao protocolo de indução de asma alérgica. Para isso, um grupo de animais naives e infectados (YP), foram tratados por via intranasal, durante 3 dias, com intervalo de 2 dias, com papaína (Sigma Aldrich) na concentração de 25 µg/µL associada à Ova (Sigma Aldrich - Grau V) na concentração de 50 µg/µL diluídas em 30 µL de salina. Após uma semana os animais foram desafiados novamente pela via intranasal com Ova 50 µg/µL diluídas em 30 µL de salina, para cada animal por 2 dias, com intervalo de uma semana entre eles (Esquema 4), de acordo com protocolo previamente descrito (HALIM *et al.*, 2018).

Protocolo 2 - Indução de Asma alérgica



Esquema 4- Delineamento experimental para indução de asma alérgica em modelo murino (Protocolo 2). Camundongos C57BL/6 foram infectados com YP por gavagem. Após 3-4 semanas foram expostos a 3 doses de papaína/Ova durante 1 semana, e em seguida desafiados durante 2 semanas com Ova, por via intranasal. Após 48 horas os animais foram eutanasiados e os leucócitos foram isolados do lavado broncoalveolar (BAL), e o pulmão separado para análise histológica.

3.6 Lavado Broncoalveolar (BAL)

As células do espaço aéreo pulmonar foram isoladas por lavagem dos pulmões por meio de um tubo traqueal com 1 mL de PBS gelado (a lavagem foi repetida 3 vezes). As células do lavado foram contadas com o auxílio do corante de exclusão de células mortas, azul de Tripan, para determinação da viabilidade. As células foram fixadas em uma lâmina através do equipamento Cytospin (Cytospin 3 Shandon TM), por 5 min a 600 RPM, e coradas com corante panótico rápido (LABORCLIN), para contagem diferencial.

3.7 Análise Histopatológica

Após a eutanásia dos camundongos infectados ou não com YP, foi coletado o pulmão esquerdo e fixado em formaldeído 10% (Synth) para posterior coloração em hematoxilina e eosina (HE), utilizada para avaliar a morfologia e infiltrado celular desses órgãos. O tecido foi processado em parafina, seguido de corte com cerca de 5 μ m e coloração com HE.

3.8 Microscopia Confocal

Os mesentérios dos animais ChAT-Reporteres Tdtomato, foram coletados em placa de 6 poços, e fixados em paraformaldeído (LGC BIOTECNOLOGIA) a 4%, diluído em PBS 1x, *overnight* a 4°C. Após esse processo, o tecido foi lavado com PBS 1x, 3 vezes por 5 min, em

agitação a 25°C. Foram adicionados 500 µL da solução de bloqueio (PBS 1x + albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin* - BSA 1 % (Inlab confiança) + Triton 0,3% (Sigma-Aldrich) + Fc Block 1:100 (BD™) por 2 h sob agitação em temperatura ambiente. Ao término do bloqueio, adicionou-se 500 µL do *mix* de anticorpos: anti-Lyve1 1:100 (e-fluor 650), anti-CD31 1:100 (e-fluor 450), anti-CD90.2 1:100 (BV 786), anti-CD45 1:100 (FITC), FC-block 1:300, diluídos em solução de bloqueio. O tecido foi incubado overnight no *mix* de anticorpos a 4°C, protegido da luz. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens em solução de bloqueio, com intervalo de 1 h em agitação. Posteriormente, o mesentério foi sobreposto em lâminas com reagente *antifade* (Prolong Gold Invitrogen), e colocou-se uma lâmina sobre o tecido. Ao término da secagem, por volta de 24 h, as lâminas foram seladas, e levadas para leitura (Microscópio Confocal: ZEISS LSM-780-NLO; disponível no Centro de Facilidades para Pesquisa - CEFAP USP).

3.9 Processamento tecidual e extração celular

Para avaliação das populações teciduais, a lâmina própria e epitélio do intestino delgado, o mesentério e os linfonodos mesentéricos, foram processados para extração celular e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os órgãos foram escolhidos de acordo com o interesse do experimento. Para a obtenção das células da lâmina própria dos intestinos seguimos o protocolo previamente padronizado (FONSECA *et al.*, 2015). Para tal, os intestinos foram coletados, as placas de Peyer removidas e realizamos a abertura longitudinal dos mesmos para realização da lavagem e remoção do conteúdo fecal com PBS 1x. O muco intestinal foi removido a partir de agitação vigorosa em solução de RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*) (Sigma-Aldrich) com EDTA (do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*) 2 mM (LGC Biotecnologia). Posteriormente, transferimos o intestino para o meio de pré-digestão com RPMI com 3% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia), 5 mM EDTA e 0,145 mg/mL de DTT (do inglês, *Dithiothreitol*) (Sigma-Aldrich) por 25 min, a 37 °C e sob agitação. Após a pré-digestão, o tecido passou novamente pela solução de RPMI com EDTA 2 mM e foi agitado vigorosamente, este procedimento foi repetido por 3 vezes seguido do corte do tecido em pequenos fragmentos para então ser digerido com 0,75 mg/mL de Colagenase IV (Sigma-Aldrich) e 0,5 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich) em meio RPMI, por 25 min a 37 °C sob agitação. Após a digestão, o tecido foi filtrado em *cell strainer de 70 e 40 µm* e as células obtidas foram ressuspensas em meio RPMI contendo 3% de SFB.

As células epiteliais do intestino delgado foram obtidas de acordo com o protocolo de extração das células da lâmina própria intestinal (FONSECA et al., 2015). Contudo, na etapa da pré-digestão foi utilizado PBS 1x em conjunto com as mesmas concentrações de SFB, EDTA e DTT, previamente descritas. Após a pré-digestão as células epiteliais foram separadas do restante do intestino, coletadas e centrifugadas. As células obtidas foram filtradas em *cell strainer* de 70 e 40 μm , e ressuspensas em meio RPMI contendo 3% de SFB.

Para o mesentério, utilizou-se do protocolo descrito previamente em FONSECA e HAND et al., 2015. Resumidamente, o tecido foi coletado com meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Corning Inc.; NOVA York, EUA), cortados em pequenos fragmentos e digeridos com 0,5 mg/mL de Colagenase IV (Sigma-Aldrich – Merck KGaA) 0,25 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich) em meio DMEM contendo 1% de BSA *low fat* (LGC BIOTECNOLOGIA) tamponado com HEPES 1M (LGC BIOTECNOLOGIA). Após digestão e inibição das enzimas por adição de 0,5 mM de EDTA, as células foram ressuspensas em meio RPMI com 3% de SFB. Quanto ao linfonodo mesentérico, a digestão foi realizada com 0,5 mg/mL Colagenase IV e 0,25 mg/mL DNase I em meio RPMI incompleto. Após digestão por 20 min a 37°C e inibição das enzimas por adição de meio RPMI com 3% de SFB e 0,5 mM de EDTA, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI com 3% SFB.

3.10 Análise das populações celulares por citometria de fluxo

Após a extração das populações celulares, foram feitas marcações para a imunofenotipagem de células do sistema imune inato (neutrófilos, eosinófilos, DCs, macrófagos e monócitos, células NK e ILCs) e análise do infiltrado linfocitário (linfócitos T CD4 e T CD8, linfócitos B, linfócitos TCR $\gamma\delta$), além da avaliação do perfil de produção de citocinas por essas células. Para marcação extracelular, as células extraídas foram transferidas para uma placa de fundo “U” de 96 poços e lavadas com tampão HBSS (do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*) (Hyclone). À suspensão de células, adicionou-se 10 μL de solução 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 *Live and Dead* (LD) (Invitrogen™ *Molecular Probes*) em tampão HBSS, por 20 min a 4°C, sob proteção da luz. Posteriormente, as células foram lavadas em tampão FACS (PBS + 2% SFB), seguido da adição de 30 μL /por poço de *mix* de

anticorpos em tampão FACS, por 30 min 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 a 2%, por 20 min 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 do *mix* dos anticorpos intracelulares em tampão de permeabilização e incubação por 30 min a 4°C, sob proteção da luz. Após, a placa foi lavada com *Perm Wash* (BD Biosciences) e FACS e as células ressuspensas em 200 µL de tampão FACS.

Após a marcação, as amostras foram adquiridas em citômetro BD LSRFortessa – X20, localizado no Centro de Facilidades e Apoio à Pesquisa – CEFAP, ICB / USP. Os anticorpos monoclonais utilizados são descritos no quadro 1. Todas as análises de citometria foram feitas com o auxílio do software FlowJo®. Para as estratégias de *gate*, dentro dos *singlets*, foram plotadas somente as células vivas (Live and Dead⁻CD45⁺). As estratégias de *gate* utilizadas para identificação das populações celulares podem ser vistas nas figuras 1, 2, 3 e 4. Para identificação de células mielóides e linfócitos T e B, as estratégias de *gate* podem ser observadas na figura 1. As análises foram feitas a partir da população de células vivas, Live and Dead⁻CD45⁺ (A). Foram identificadas as seguintes populações: linfócitos B (TCR-β⁻CD19⁺); linfócitos T (TCR-β⁺CD19⁻); neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺); eosinófilos (CD11b⁺MHCII⁻Ly6C⁻SiglecF⁺); macrófagos (CD11b⁺CD64⁺F4/80⁺Ly6C⁻); monócitos (CD11b⁺CD64⁻F4/80⁻Ly6C⁺); DCs (TCR-β⁻CD19⁻SiglecF⁻Ly6G⁻Ly6C⁻CD64⁻F480⁻CD11c⁺MHCII⁺).

Para identificação de células mielóides e linfóides, tendo em foco a população de células Dendríticas e Células Linfóides Inatas, as estratégias de *gate* podem ser observadas na figura 2. As análises foram feitas a partir da população de células vivas, Live and Dead⁻CD45⁺ (A). Foram identificadas as seguintes populações: (B) Macrófagos M2 (Thy1.2⁻CD206⁺CD11b⁺); (C) Células Dendríticas (Thy1.2⁻CD206⁻CD11c⁺MHCII⁺ CD103⁺ ou CD11b⁺ ou CD103⁺CD11b⁺); (D) Linfócitos T (Thy1.2⁺TCRβ⁺); (E) ILCs (Thy1.2⁺TCRβ⁻).

A análise das células de origem linfóide (com exceção dos linfócitos B) pode ser vista na figura 2. As *gates* foram feitas a partir da população de células vivas, Live and Dead⁺CD45⁺ e Thy1.2⁺ (CD90.1). Foram caracterizadas ILCs (Thy1.2⁺TCR-β⁻) em células TCR-β⁺(Thy1.2⁺TCR-β⁺). Dentro destas populações, foi analisada a expressão dos seguintes fatores de transcrição celular: Tbet, GATA-3 e RORγt. As ILCs foram separadas em: ILC1 (Tbet⁺GATA-3⁻RORγt⁻), ILC2 (Tbet⁻GATA-3⁺RORγt⁻) e ILC3 (Tbet⁻GATA-3⁻RORγt⁺). Em relação a produção de citocinas a análise foi feita dentro da população CD45⁺ e Thy1.2⁺ (CD90.1), como observado na figura 3. Além disso, a produção das seguintes citocinas: IFN-γ, IL-1-β, IL-17, IL-5 e IL-13, foi analisada, dentro da população de ILCs, e TCR-β⁺, e NK (TCR-β⁻ NK1.1⁺). A ativação celular foi observada através da expressão de CD44, assim como visto na figura 4.

Fluorocromo	Molécula	Clone	Fluorocromo	Molécula	Clone
FITC	XCR1	2ET	AF700	MHCII	M5/114.15.2
	GATA3	L50-823		CD8β	RPA-T8
	LY6G	1A8		LY6C	HK1.4
	TCRγδ Biotinilado	GL3	AF488	IL-13	Ebiol13a
PE	SiglecF	1RNM44N	AF780	TCRβ	H57-597
	IL-5	TRFK5		B220	RA3-6B2
	FoxP3	FJK-16s		CD11b	CO8C2
PERCP	LY6C	HK1.4	BV421	CD206	CO8C2
	RORγT	B2D		CD64	10.1
	NKp46	29A.1.4		CD45	30-F11
	KLRG1	2F1		Thy1.2	30-H12
	IL-17	eBiol17B7	BV510	LD	
PECY7	F4/80	BM8	BV605	CD11b	M1/70
	Ki67	16A8		CD4	RM4-5
	CD19	1D3	BV650	CD45	30-F11
	ST2	DIH4		NK1.1	PK136
	IFN-γ	B27		SiglecF	1RNM44N
PECF594	Ly6G	1A8	BV711	CD19	6D5

	TCR $\gamma\delta$	CL3		CD44	IM7
APC	CD103	2E7	BV786	CD206	CO8C2
	LYVE1	ALY-7		CD11c	N418
	F4/80	BM8		Thy1.2	30-H12
	IL-1 β	NJTEN3			

Quadro 1: Clones de anticorpos utilizados para imunofenotipagem das células dos intestinos delgado e epitélio do intestino delgado, mesentérico, e linfonodo mesentérico.

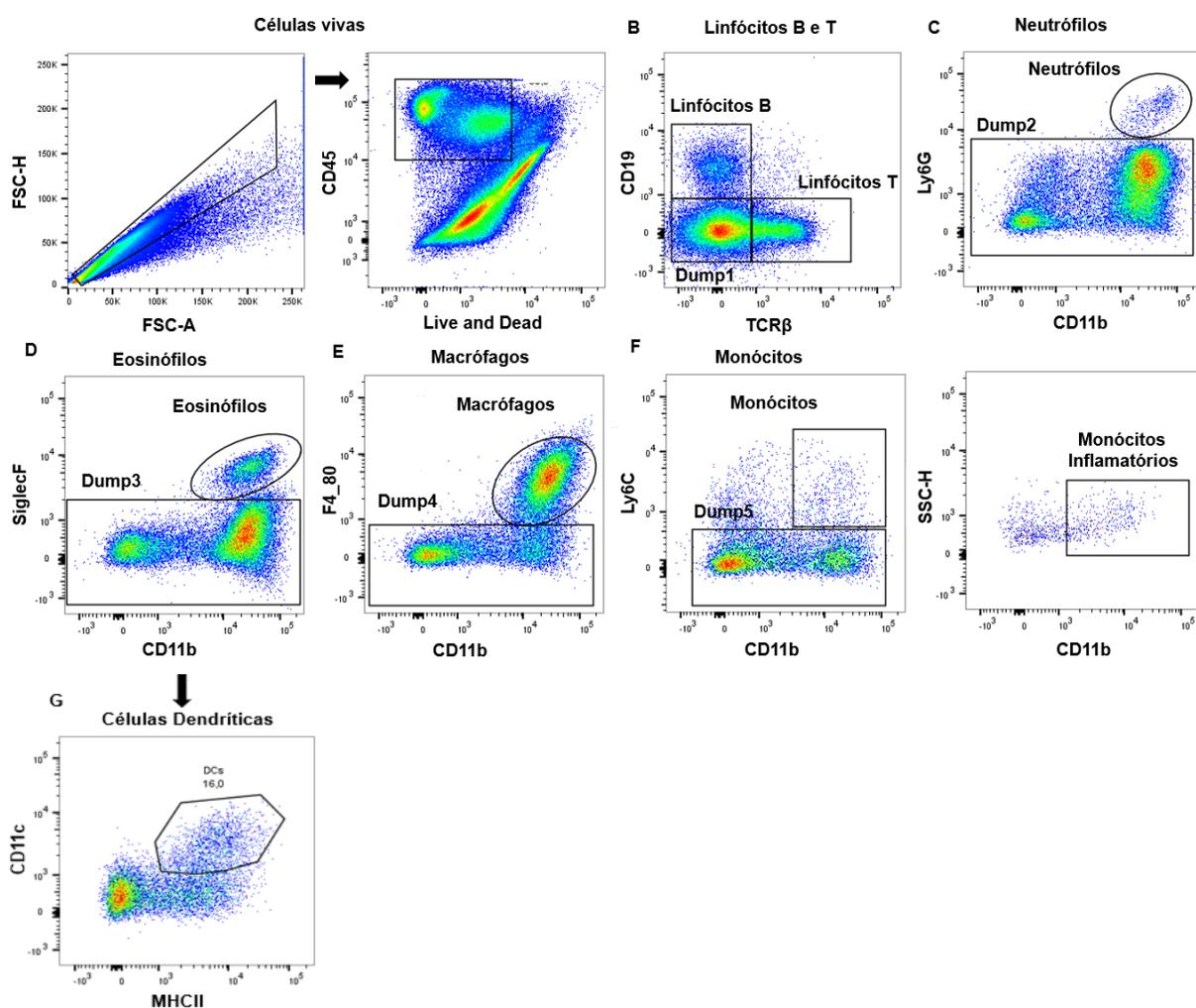


Figura 1- Estratégia de *gate* utilizada para identificação das populações de células mielóides e linfóides. (A) As análises foram feitas a partir da população de células vivas, Live and Dead- CD45+. Foram identificadas as seguintes populações: (B) linfócitos T (TCR- β + CD19-); linfócitos B (TCR- β - CD19+); (C) neutrófilos (CD11b+ Ly6G+); (D) eosinófilos (CD11b+ MHC-II- Ly6G- SiglecF+); (E) macrófagos (CD11b+ F4/80+ Ly6C-); monócitos (CD11b+ F4/80- Ly6C+); (F) células dendríticas (TCR β - CD19- SiglecF- Ly6G- Ly6C- F480- CD11c+ MHCII+). As análises foram feitas com o auxílio do software FlowJo™.

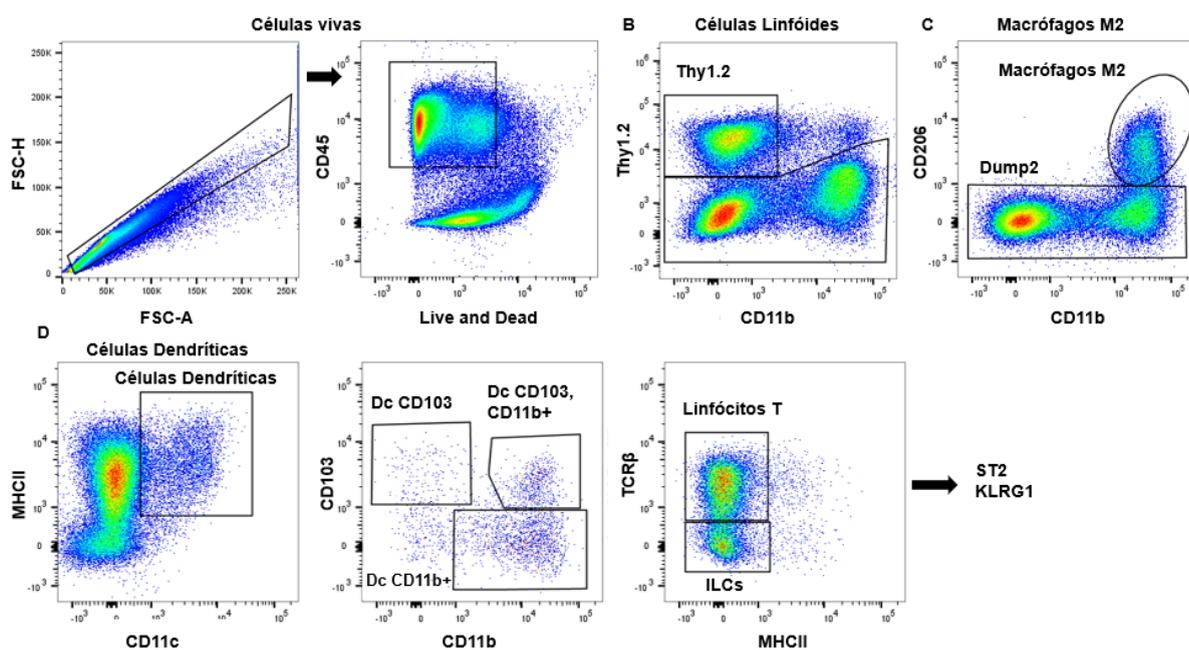


Figura 2- Estratégia de *gate* utilizada para identificação das populações de células mielóides e linfóides e expressão dos receptores ST2 e KLRG1. (A) As análises foram feitas a partir da população de células vivas, Live and Dead⁻ CD45⁺. Foram identificadas as seguintes populações: (B) Macrófagos M2 (Thy1.2⁻ CD206⁺ CD11b⁺); (C) Células Dendríticas (Thy1.2⁻ CD206⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ CD103⁺ ou CD11b⁺ ou CD103⁺CD11b⁺); (D) Linfócitos T (Thy1.2⁺ TCRβ⁺); (E) ILCs (Thy1.2⁺ TCRβ⁻). A expressão dos receptores ST2 e KLRG1 foi verificada nas seguintes populações: (D) Linfócitos T (Thy1.2⁺ TCRβ⁺); (E) ILCs (Thy1.2⁺ TCRβ⁻). As análises foram feitas com o auxílio do software FlowJo™.

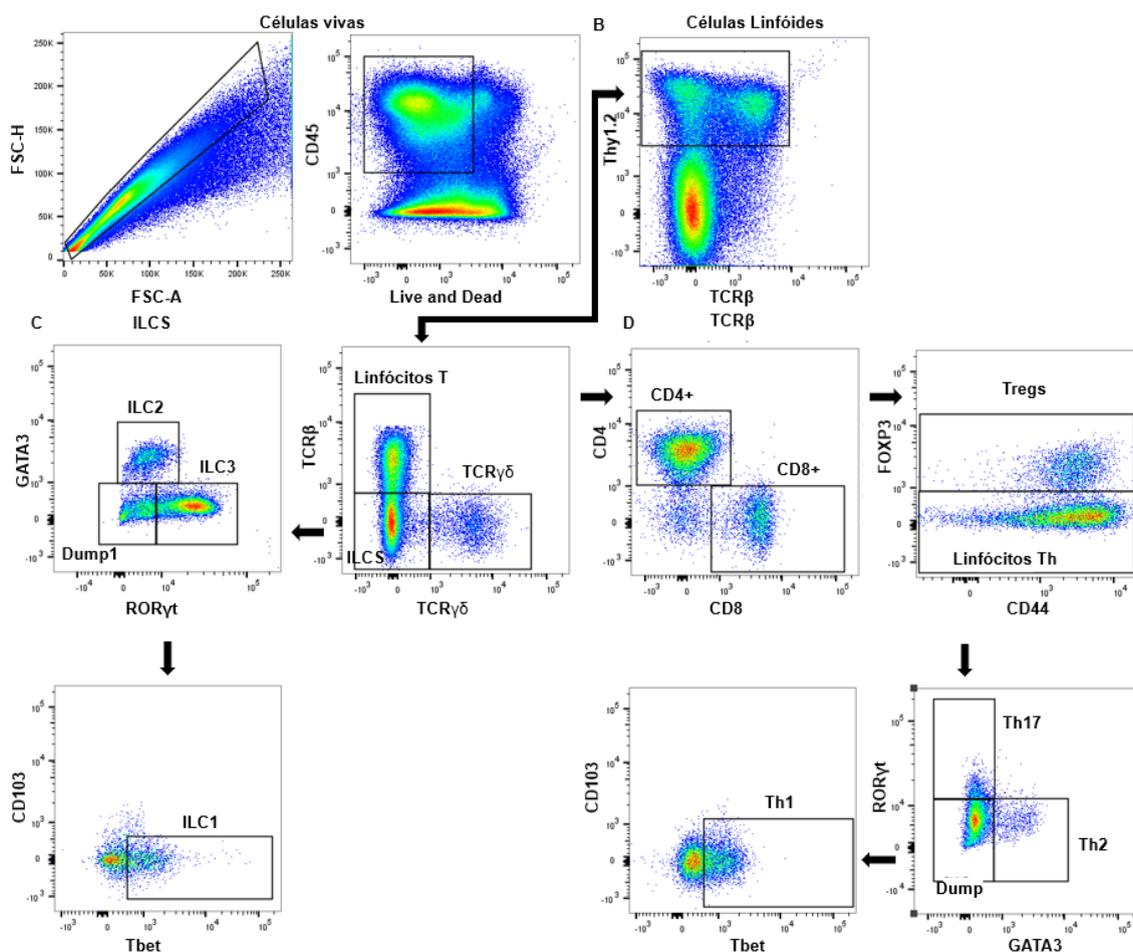


Figura 3- Estratégia de *gate* utilizada para identificação das populações de células de origem linfóide. (A) As análises foram feitas a partir da população linfóide viva que expressa ou não TCR- β , para ILCs (Live and Dead- CD45⁺ Thy1.2⁺ TCR- β ⁻) e linfócitos T (Live and Dead- CD45⁺ Thy1.2⁺ TCR- β ⁺), respectivamente. Foram caracterizadas (B) ILCs (Thy1.2⁺ TCR- β ⁻) e (C) células TCR- β positivas (Thy1.2⁺ TCR- β ⁺). Dentro destas populações, foi analisada a expressão dos seguintes fatores de transcrição celular: Tbet, GATA-3, ROR γ t e FoxP3. As análises foram feitas com o auxílio do software FlowJo™.

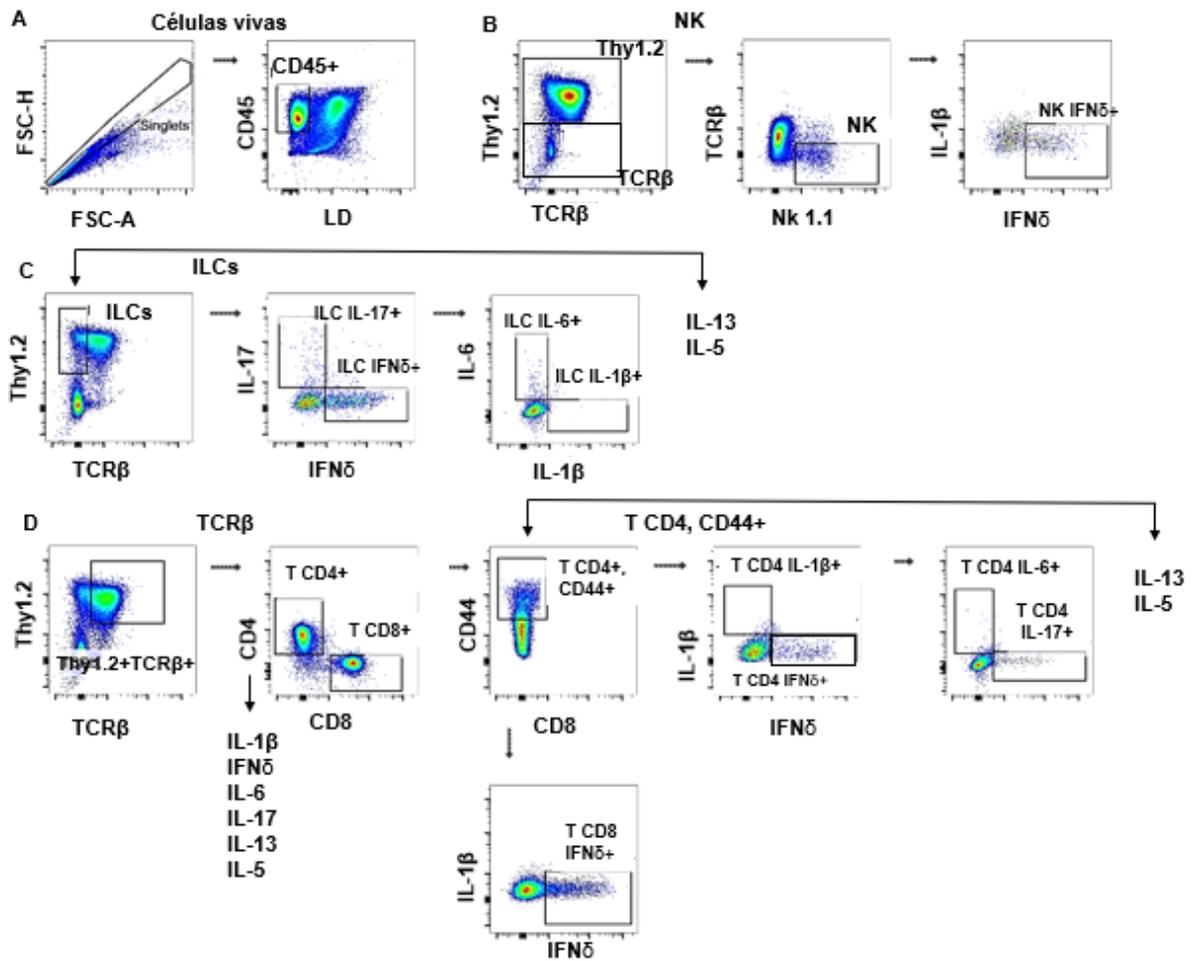


Figura 4- Estratégia de *gate* utilizada para análise de produção de citocinas.

(A) A análise da produção de citocinas também foi feita dentro da população de leucócitos vivos (Live and Dead- CD45+ e Thy1.2+) Dentro das populações de (B) NK (TCR-β- NK1.1+), (C) ILCs e (D) TCR-β+, a produção das seguintes citocinas pode ser analisada: IFN-γ, IL-1-β, IL-17 e IL-6.

3.11 Análise por tSNE (*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*)

Para algumas populações celulares, fizemos a caracterização por análise algorítmica de tSNE. Este tipo de análise é capaz de computar os parâmetros derivados da análise e os aproxima por similaridades de marcadores, reduzindo a complexidade dos dados gerados em um gráfico bidimensional. As estratégias utilizadas nas análises podem ser observadas na Figura 5. Nas células de origem mielóide, a análise foi realizada dentro dos leucócitos vivos (Live and Dead-CD45+), enquanto que para fator de transcrição, a análise foi realizada dentro de linfócitos vivos (Live and Dead-CD45+Thy1.2+). A partir de leucócitos e linfócitos vivos, respectivamente, realizamos o *DownSample* de modo a garantir que todos os grupos

apresentassem o mesmo número de células previamente escolhido. Posteriormente, concatenamos o *DownSample* para estabelecer as similaridades entre os marcadores e o algoritmo foi aplicado, preconizando-se um total de 2000 interações por evento e uma perplexidade de 45. Após as interações, os grupos experimentais foram separados e as populações celulares delimitadas. As estratégias de *gate* utilizadas para a análise dos dados com o algoritmo foram as mesmas utilizadas para determinar as populações na análise por citometria.

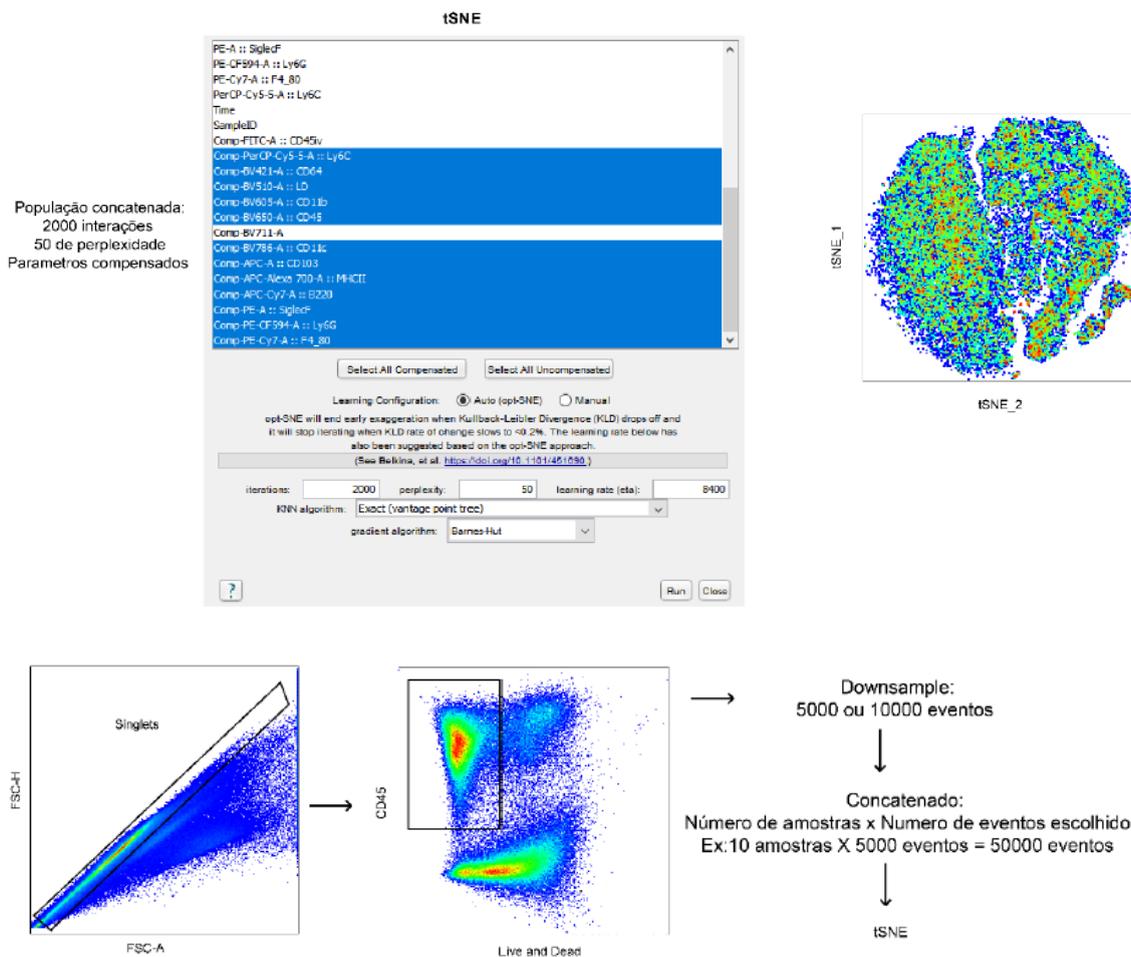


Figura 5- Análise “t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE). Foi realizada a análise convencional de citometria de fluxo com programa Flowjo, com a finalidade de obter os leucócitos vivos. (Live and Dead^{CD45+}). Foi realizado o “DownSample” (Redução proporcional) dessa população celular e em seguida a mesma foi concatenada (agrupadas a partir da população reduzida). Utilizamos 5000 ou 10000 eventos por amostra. Para o processo de concatenação, aplicamos os parâmetros pré-estabelecidos de 2000 interações, perplexidade de 50 e selecionamos apenas os marcadores de interesse (para marcações extracelulares e intracelulares) e parâmetros compensados. Por fim, aplicamos o algoritmo tSNE.

3.12 Análise por UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*)

Também realizamos a caracterização das populações por análise algorítmica UMAP, esta é uma técnica de redução de dimensão que pode ser usada para visualização de forma semelhante ao t-SNE. Realizamos da mesma forma o *DownSample* nas populações de células mieloides e linfoides e concatenamos as amostras. O algoritmo foi aplicado nas amostras concatenadas, aplicando os parâmetros de análise euclidiana, Nearest Neighbors: 15; Minimum Distance: 0,5; e Number of Components: 2. As estratégias de *gate* utilizadas para a análise dos dados com o algoritmo foram as mesmas utilizadas para determinar as populações na análise por citometria.

3.13 Análise Estatística

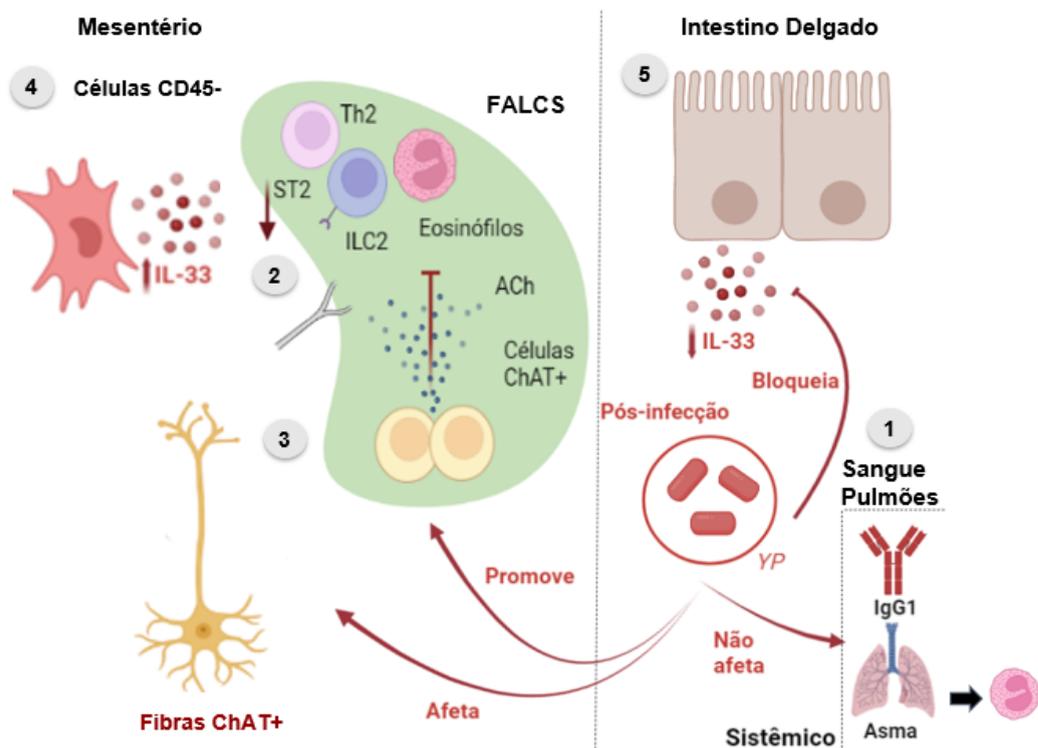
Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa *GraphPad Prism 8.0*. Os dados foram expressos a partir da média (\pm) erro padrão da média e os resultados comparados usando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. 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 $p < 0,05$.

5. Conclusões

Vimos anteriormente, por resultados prévios do nosso grupo e por resultados apresentados neste documento, que camundongos infectados por YP perderam a capacidade de produzir a resposta imune do tipo 2 no intestino e mesentério, com a redução de células Th2 e DCs, somados à perda de ILC2 e eosinófilos no mesentério. Notamos também que, apesar de uma redução parcial dos níveis de IgG1 pós-infecção, os camundongos infectados foram igualmente ou até mais susceptíveis a desenvolverem inflamação em modelo de asma nos pulmões. Tudo isso indica que a deficiência na indução da resposta do tipo 2 ocorre localmente no intestino e órgãos associados, contudo acontece de modo parcial sistemicamente, pois a produção de IgG1 e a indução de asma pulmonar continuam funcionais.

Além do mais, quando analisamos os efeitos da infecção sobre o mesentério, também notamos que há uma importante redução da expressão dos receptores ST2 e KLRG1 nas ILCs e células T do tecido, sendo este efeito prejudicial para comunicação entre os componentes da resposta imune do tipo 2, principalmente para sua interação com a liberação de IL-33.

Dito isto, observamos que a inervação colinérgica do mesentério parece ser comprometida após infecção por YP, porém leucócitos presentes nos FALCs parecem assumir esta função e direcionar a produção de acetilcolina para os FALCs, onde a resposta do tipo 2 é de fato comprometida. Já no epitélio intestinal, observamos esta modulação ocorrer pela infecção por YP, visto que após a infecção há a redução da produção de IL-33 pelos enterócitos. Este fenômeno pode estar ligado à perda da capacidade da indução de respostas do tipo 2 neste tecido, resultando na diminuição da população de ILC2 e linfócitos Th2, e consequente queda em sua proliferação. Além da perda desta resposta, a IL-33 possui importante função em auxiliar na defesa da barreira, evitando a entrada de microrganismos para dentro da lâmina própria. Deste modo após a infecção acreditamos que essa função também se torna comprometida, resultando em uma falha que contribui para o aumento da inflamação, e impacta na promoção de novas respostas de reparo na mucosa intestinal.



Esquema 5- Modelo proposto para conclusão dos dados apresentados. (1) Após a infecção por YP ocorre um comprometimento da resposta do tipo 2 no intestino delgado e no mesentério, impactando o reparo e a homeostase tecidual. Contudo este fenômeno ocorre de forma local e não sistêmica, assim como visto pela produção de anticorpos IgG1 no sangue dos animais e pela capacidade de indução de asma; (2) Há uma redução da expressão do receptor ST2 por ILCs e linfócitos T, podendo acarretar em respostas disfuncionais, e redução da sinalização com a IL-33; (3) Ocorre a perda das fibras ChAT+ no mesentério, e os leucócitos ChAT+ presentes nos FALCs podem estar assumindo a produção de acetilcolina, bloqueando a resposta do tipo 2 de modo local; (4) Existe um aumento da produção de IL-33 pelas células estromais do mesentério; (5) Em contrapartida ocorre a redução da produção de IL-33 pelas células epiteliais intestinais, o que pode afetar o tônus do tipo 2 neste tecido, além de impactar as respostas de reparo na mucosa intestinal.

6. Referências Bibliográficas

- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, fev. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406001905>>.
- ALQAHTANI, S. et al. Acetylcholine Receptors in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*, v. 32, n. 3–4, p. 47–59, 1 fev. 2023. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2022.0201>>.
- ARTIS, D.; SPITS, H. The Biology of Innate Lymphoid Cells. **Nature**, v. 517, p. 293–301. jan 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature14189#citeas>>.
- ATARASHI, K.; et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. **Cell**, v. 163, n. 2, p. 367–380, out. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415011101>>.
- BÄCKHED, F. et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 5, p. 690–703, maio 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312815001626>>.
- BARTNESS, T. J.; LIU, Y.; SHRESTHA, Y. B.; RYU, V. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 473–493, out. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302214000430>>.
- BARTNESS, T. J. et al. Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 318, n. 1–2, p. 34–43, abr. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720709004559>>.
- BATRA, A.; et al. Mesenteric fat—control site for bacterial translocation in colitis? **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 5, p. 580–591, set. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193302192201337X>>.
- BEALL, C.; HANNA, L.; ELLACOTT, K. L. J. CNS Targets of Adipokines. *In: Comprehensive Physiology*. [s.l.] Wiley, 2017. p. 1359–1406.
- BECKMANN, J.; LIPS, K. S. The Non-Neuronal Cholinergic System in Health and Disease. **Pharmacology**, v. 92, n. 5–6, p. 286–302, 2013. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/355835>>.
- BEKIARIS, V.; PERSSON, E. K.; AGACE, W. W. Intestinal dendritic cells in the regulation

of mucosal immunity. **Immunological Reviews**, v. 260, n. 1, p. 86–101, jul. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12194>>.

BELKAID, Y.; BOULADOUX, N.; HAND, T. W. Effector and memory T cell responses to commensal bacteria. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 6, p. 299–306, jun. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490613000483>>.

BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121–141, mar. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414003456>>.

BÉNÉZECH, C.; JACKSON-JONES, L. H. ILC2 Orchestration of Local Immune Function in Adipose Tissue. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 7 fev. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00171/full>>.

BÉNÉZECH, C. et al. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. **Nature Immunology**, v. 16, n. 8, p. 819–828, 29 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni.3215>>.

BEPPU, L. Y. et al. Tregs facilitate obesity and insulin resistance via a Blimp-1/IL-10 axis. **JCI Insight**, v. 6, n. 3, 8 fev. 2021. Disponível em: <<https://insight.jci.org/articles/view/140644>>.

BERGSBAKEN, T.; BEVAN, M. J. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8⁺ T cells responding to infection. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 406–414, 23 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni.3108>>.

BILATE, A. M. et al. T Cell Receptor Is Required for Differentiation, but Not Maintenance, of Intestinal CD4⁺ Intraepithelial Lymphocytes. **Immunity**, v. 53, n. 5, p. 1001–1014.e20, nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761320303976>>.

BLASZKIEWICZ, M. et al. The Importance of Peripheral Nerves in Adipose Tissue for the Regulation of Energy Balance. **Biology**, v. 8, n. 1, p. 10, 12 fev. 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-7737/8/1/10>>.

BORA, P.; MAJUMDAR, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 145, 15 dez. 2017. Disponível em: <<http://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0598-y>>.

BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458–462, maio 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35013070>>.

BOURIN, P. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. **Cytherapy**, v. 15, n. 6, p. 641–648, jun. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324913003873>>.

BRENCHLEY, J. M. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Retrovirology**, v. 3, n. S1, p. S98, 21 dez. 2006. Disponível em: <<https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-3-S1-S98>>.

BRESTOFF, J. R. et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. **Nature**, v. 519, n. 7542, p. 242–246, 22 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature14115>>.

CADER, M. Z.; KASER, A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. **Gut**, v. 62, n. 11, p. 1653–1664, nov. 2013. Disponível em: <<https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2012-303955>>.

CERVANTES-BARRAGAN, L. et al. Lactobacillus reuteri induces gut intraepithelial CD4 + CD8 α + T cells. **Science**, v. 357, n. 6353, p. 806–810, 25 ago. 2017. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aah5825>>.

CHU, C. et al. The ChAT-acetylcholine pathway promotes group 2 innate lymphoid cell responses and anti-helminth immunity. **Science Immunology**, v. 6, n. 57, 4 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abe3218>>.

CHU, D. K. et al. Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1657–1672, 28 jul. 2014. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/211/8/1657/41735/Indigenous-enteric-eosinophils-control-DCs-to>>.

CHUNG, K.-J. et al. Innate immune cells in the adipose tissue. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 19, n. 4, p. 283–292, 19 dez. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11154-018-9451-6>>.

COFFEY, J. C.; O'LEARY, D. P. The mesentery: structure, function, and role in disease. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 1, n. 3, p. 238–247, nov. 2016. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468125316300267>>.

COFFEY, J. C. et al. Mesentery — a ‘New’ organ. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 2, p. 191–206, 8 set. 2020. Disponível em: <<https://portlandpress.com/emergtoplifesci/article/4/2/191/225263/Mesentery-a-New-organ>>.

COMMINS, S. P. Mechanisms of Oral Tolerance. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 6, p. 1523–1529, dez. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031395515001364>>.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1757–1764, 6 ago. 2007. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/204/8/1757/46978/A-functionally-specialized-population-of-mucosal>>.

COX, M. A. et al. Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity and inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, n. 2, p. 120–133, 3 fev. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.13006>>.

CRUZ-MIGONI, S.; CAAMAÑO, J. Fat-Associated Lymphoid Clusters in Inflammation and Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 21 dez. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00612/full>>.

CURTIS, M. M. et al. The Gut Commensal Bacteroides thetaiotaomicron Exacerbates Enteric Infection through Modification of the Metabolic Landscape. **Cell Host & Microbe**, v. 16, n. 6, p. 759–769, dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312814004211>>.

DALE, H. H. The Action of Certain Esters and Ethers of Choline, and their Relation to Muscarine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 6, n. 2, p. 147-190, nov. 1914. Disponível em: <<https://jpet.aspetjournals.org/content/6/2/147>>.

DAS, G.; AUGUSTINE, M. M.; DAS, J.; BOTTOMLY, K.; RAY, P.; RAY, A. An important regulatory role for CD4 + CD8 $\alpha\alpha$ T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5324–5329, 29 abr. 2003. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0831037100>>.

DARBI, M. et al. ILC3-derived acetylcholine promotes protease-driven allergic lung pathology. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 4, p.1513-1516, abr. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8022224/>>.

DENNING, T. L. et al. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. **Nature Immunology**, v. 8, n. 10, p. 1086–1094, 16 out. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni1511>>.

DENUCCI, C. C. et al. Control of $\alpha 4\beta 7$ Integrin Expression and CD4 T Cell Homing by the $\beta 1$ Integrin Subunit. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 5, p. 2458–2467, 1 mar. 2010. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/184/5/2458/82280/Control-of-4-7-Integrin-Expression-and-CD4-T-Cell>>.

DHAWAN, S. et al. Acetylcholine-producing T cells in the intestine regulate antimicrobial peptide expression and microbial diversity. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 311, n. 5, p. G920–G933, 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00114.2016>>.

DUPRAZ, L. et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids regulate IL-17 production by mouse and human intestinal $\gamma\delta$ T cells. **Cell Reports**, v. 36, n. 1, p. 109332, jul. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124721007087>>.

EBERL, G.; COLONNA, M.; DI SANTO, J. P.; MCKENZIE, A. N. J. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. **Science**, v. 348, n. 6237, 22 maio 2015. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaa6566>>.

FELLOWS, R. et al. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 105, 9 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-017-02651-5>>.

FIRACATIVE, C. et al. Identification of T helper (Th)1- and Th2-associated antigens of *Cryptococcus neoformans* in a murine model of pulmonary infection. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2681, 8 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-21039-z>>.

FLEMING, A.; CASTRO-DOPICO, T.; CLATWORTHY, M. R. B cell class switching in intestinal immunity in health and disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 95, n. 2, 12 fev. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sji.13139>>.

FONSECA, D. M. da. et al. Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise

Tissue-Specific Immunity. **Cell**, v. 163, n. 2, p. 354–366, out. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415010442>>.

FRIAS, A. B. et al. The Transcriptional Regulator Id2 Is Critical for Adipose-Resident Regulatory T Cell Differentiation, Survival, and Function. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 3, p. 658–664, 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/203/3/658/107393/The-Transcriptional-Regulator-Id2-Is-Critical-for>>.

FRISBEE, A. L. et al. IL-33 drives group 2 innate lymphoid cell-mediated protection during *Clostridium difficile* infection. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 2712, 20 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-10733-9>>.

FUJII, T.; KAWASHIMA, K. Calcium Signaling and c-Fos Gene Expression via M3 Muscarinic Acetylcholine Receptors in Human T- and B-Cells. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 124–132, 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021519819305232>>.

FUJII, T.; TAKADA-TAKATORI, Y.; KAWASHIMA, K. Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 21–22, p. 981–985, nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320512002214>>.

FURNESS, J. B. The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. **Autonomic Neuroscience**, v. 130, n. 1–2, p. 1–5, dez. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566070206001652>>.

GABORIAU-ROUTHIAU, V. et al. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 677–689, out. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476130900404X>>.

GIBBONS, C. H. Basics of autonomic nervous system function. *In*: [s.l.: s.n.]p. 407–418.

GIORDANO, A. et al. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 5, p. R1243–R1255, nov. 2006. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00679.2005>>.

HAND, T. W. et al. Acute Gastrointestinal Infection Induces Long-Lived Microbiota-Specific T Cell Responses. **Science**, v. 337, n. 6101, p. 1553–1556, 21 set. 2012. Disponível em:

<<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1220961>>.

HAND, T. W. et al. Linking the Microbiota, Chronic Disease, and the Immune System. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 12, p. 831–843, dez. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276016301060>>.

HEIMESAAT, M. M. et al. Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8785–8795, 15 dez. 2006. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/177/12/8785/73973/Gram-Negative-Bacteria-Aggravate-Murine-Small>>.

HENSON, S. M.; AKBAR, A. N. KLRG1—more than a marker for T cell senescence. **AGE**, v. 31, n. 4, p. 285–291, 29 dez. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11357-009-9100-9>>.

HINE, A. M.; LOKE, P. Intestinal Macrophages in Resolving Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 3, p. 593–599, 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/203/3/593/107372/Intestinal-Macrophages-in-Resolving-Inflammation>>.

HIRAHARA, K.; MATO, N.; HAGIWARA, K.; NAKAYAMA, T. The pathogenicity of IL-33 on steroid-resistant eosinophilic inflammation via the activation of memory-type ST2+CD4+ T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 104, n. 5, p. 895–901, 19 out. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jleukbio/article/104/5/895/6935426>>.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 8 jun. 2012. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1223490>>.

HU, B. et al. $\gamma\delta$ T cells and adipocyte IL-17RC control fat innervation and thermogenesis. **Nature**, v. 578, n. 7796, p. 610–614, 27 fev. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41586-020-2028-z>>.

HU, Z. et al. The Role of KLRG1 in Human CD4+ T-Cell Immunity Against Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 9, p. 1491–1503, 11 abr. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/217/9/1491/4823593>>.

HUANG, Y. et al. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. **Nat Immunol**. v. 16, n. 2, p. 161–169. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.3078>>

HUNG, L.-Y. et al. Cellular context of IL-33 expression dictates impact on anti-helminth immunity. **Science Immunology**, v. 5, n. 53, 13 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abc6259>>.

IGNACIO, A. et al. Small intestinal resident eosinophils maintain gut homeostasis following microbial colonization. **Immunity**, v. 55, n. 7, p. 1250- 1267.e12, jul. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761322002345>>.

IVANOV, I. I. et al. Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. **Cell Host & Microbe**, v. 4, n. 4, p. 337–349, out. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312808003053>>.

IWASAKI, A.; KELSALL, B. L. Freshly Isolated Peyer's Patch, but Not Spleen, Dendritic Cells Produce Interleukin 10 and Induce the Differentiation of T Helper Type 2 Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 2, p. 229–240, 19 jul. 1999. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/190/2/229/20543/Freshly-Isolated-Peyers-Patch-but-Not-Spleen>>.

KABAT, A. M. et al. Resident T H 2 cells orchestrate adipose tissue remodeling at a site adjacent to infection. **Science Immunology**, v. 7, n. 76, 21 out. 2022. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.add3263>>.

KAWASHIMA, K. et al. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. **Life Sciences**, v. 91, n. 21–22, p. 1027–1032, nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320512002652>>.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, jun. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2004-0395>>.

KOARAI, A. et al. Expression of muscarinic receptors by human macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 3, p. 698–704, 1 mar. 2012. Disponível em: <<http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00136710>>

KOBORI, A.; YAGI, Y.; IMAEDA, H.; BAN, H.; BAMBHA, S.; TSUJIKAWA, T.; SAITO, Y.; FUJIYAMA, Y.; ANDOH, A. Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. **Journal of Gastroenterology**, v. 45, n. 10, p. 999–1007, 20 out. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00535-010-0245-1>>.

KOH, A. et al. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key

Bacterial Metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741630592X>>.

KOHLGRUBER, A. C. et al. $\gamma\delta$ T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. **Nature Immunology**, v. 19, n. 5, p. 464–474, 18 maio 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41590-018-0094-2>>.

KREIER, F.; BUIJS, R. M. Evidence for parasympathetic innervation of white adipose tissue, clearing up some vagaries. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 1, p. R548–R549, jul. 2007. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00890.2006>>.

LAFFONT, S.; SIDDIQUI, K. R. R.; POWRIE, F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 7, p. 1877–1883, jul. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.200939957>>.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837–848, fev. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406001929>>.

LI, H. et al. Mucosal or systemic microbiota exposures shape the B cell repertoire. **Nature**, v. 584, n. 7820, p. 274–278, 13 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2564-6>>.

LIU, O. et al. Adipose-mesenchymal stromal cells suppress experimental Sjögren syndrome by IL-33-driven expansion of ST2+ regulatory T cells. **iScience**, v. 24, n. 5, p. 102446, maio 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589004221004144>>.

LIU, Z. et al. Activation of $\alpha 7nAChR$ by Nicotine Reduced the Th17 Response in CD4 + T Lymphocytes. **Immunological Investigations**, v. 43, n. 7, p. 667–674, 20 out. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08820139.2014.914532>>.

LÖHNING, M. et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6930–6935, 9 jun. 1998. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.95.12.6930>>.

LUPP, C. et al. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell Host & Microbe**, v. 2, n. 2, p. 119–129, ago. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312807001576>>.

MA, Y.; JUN, H.; WU, J. Immune cell cholinergic signaling in adipose thermoregulation and immunometabolism. **Trends in Immunology**, v. 43, n. 9, p. 718–727, set. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490622001430>>.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 95, n. 1, p. 50–60, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jaoac/article/95/1/50-60/5655139>>.

MACPHERSON, A. J.; SLACK, E. The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 673–678, nov. 2007. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00001574-200711000-00015>>.

MAHLAKÖIV, T. et al. Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33. **Science Immunology**, v. 4, n. 35, 24 maio 2019. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.aax0416>>.

MAKKI, K.; DEEHAN, E. C.; WALTER, J.; BÄCKHED, F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 6, p. 705–715, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193131281830266X>>.

MATHEIS, F. et al. Adrenergic Signaling in Muscularis Macrophages Limits Infection-Induced Neuronal Loss. **Cell**, v. 180, n. 1, p. 64–78.e16, jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867419313285>>.

MATO, N.; HIRAHARA, K.; ICHIKAWA, T.; KUMAGAI, J.; NAKAYAMA, M.; YAMASAWA, H.; BANDO, M.; HAGIWARA, K.; SUGIYAMA, Y.; NAKAYAMA, T. Memory-type ST2+CD4+ T cells participate in the steroid-resistant pathology of eosinophilic pneumonia. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6805, 28 jul. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-06962-x>>.

MCDONALD, B. D.; JABRI, B.; BENDELAC, A. Diverse developmental pathways of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 8, p. 514–525, 1 ago. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41577-018-0013-7>>.

MEININGER, I. et al. Tissue-Specific Features of innate Lymphoid Cells. **Cell**, v. 41, n. 10, p.902-917, set. 2020. Disponível em: <[https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906\(20\)30186-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471490620301861%3Fshoall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906(20)30186-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471490620301861%3Fshoall%3Dtrue)>.

MEINZER, U. et al. Yersinia pseudotuberculosis Effector YopJ Subverts the

Nod2/RICK/TAK1 Pathway and Activates Caspase-1 to Induce Intestinal Barrier Dysfunction. **Cell Host & Microbe**, v. 11, n. 4, p. 337–351, abr. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312812000959>>.

MILLING, S. W.; JENKINS, C.; MACPHERSON, G. Collection of lymph-borne dendritic cells in the rat. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2263–2270, 21 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2006.315>>.

MILLS, K. H. G. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 1, p. 38–54, 5 jan. 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41577-022-00746-9>>.

MONTUFAR-SOLIS, D.; GARZA, T.; KLEIN, J. R. T-cell activation in the intestinal mucosa. **Immunological Reviews**, v. 215, n. 1, p. 189–201, fev. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2006.00471.x>>.

MOREIRA LOPES, T. C.; MOSSER, D. M.; GONÇALVES, R. Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. **Inflammation Research**, v. 69, n. 12, p. 1163–1172, 4 dez. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00011-020-01398-y>>.

MORIMOTO, Y. et al. Amphiregulin-Producing Pathogenic Memory T Helper 2 Cells Instruct Eosinophils to Secrete Osteopontin and Facilitate Airway Fibrosis. **Immunity**, v. 49, n. 1, p. 134–150.e6, jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761318301924>>.

MORIYAMA, S.; ARTIS, D. Neuronal regulation of group 2 innate lymphoid cells and type 2 inflammation. **Advances in Immunology**, v. 143, p.1-9. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065277619300288?via%3Dihub>>.

MORO, K. et al. Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphoid cells. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 540–544, 28 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature08636>>.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 19 out. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nri3738>>.

MUCIDA, D. et al. Reciprocal T H 17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256–260, 13 jul. 2007. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1145697>>.

- NEGI, S. et al. Potential Role of Gut Microbiota in Induction and Regulation of Innate Immune Memory. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 25 out. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02441/full>>.
- NGUYEN, A. et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 69, n. 2, p. 170–179, fev. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748681515004994>>.
- NOGAL, A.; VALDES, A. M.; MENNI, C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2021.1897212>>.
- OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D.; VAN KAER, L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 4, p. 264–275, abr. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490617302132>>.
- PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 3, p. 232–239, maio 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1933021922013010>>.
- PALMER, G.; GABAY, C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 6, p. 321–329, 26 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrrheum.2011.53>>.
- PAPOTTO, P. H.; YILMAZ, B.; SILVA-SANTOS, B. Crosstalk between $\gamma\delta$ T cells and the microbiota. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1110–1117, 2 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41564-021-00948-2>>.
- PARIMISETTY, A. et al. Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors—an emerging frontier in the neurodegenerative research. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 67, 24 dez. 2016. Disponível em: <<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-016-0530-x>>.
- PERSSON, E. K. et al. IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103+CD11b+ Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 958–969, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313001489>>.
- PRICE, E. A. et al. Systemically dispersed innate IL-13–expressing cells in type 2 immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 25, p. 11489–11494, 7 jun.

2010. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1003988107>>.
- QIAN, J. et al. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. **Genes & Immunity**, v. 12, n. 3, p. 222–230, 27 abr. 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/gene201072>>.
- QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59–65, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature08821>>.
- RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 229–241, jul. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404006610>>.
- RAMIREZ, V. T. et al. T-cell derived acetylcholine aids host defenses during enteric bacterial infection with *Citrobacter rodentium*. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007719, 11 abr. 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1007719>>.
- RANA, B. M. J. et al. A stromal cell niche sustains ILC2-mediated type-2 conditioning in adipose tissue. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 9, p. 1999–2009, 2 set. 2019. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/216/9/1999/120704/A-stromal-cell-niche-sustains-ILC2-mediated-type2>>.
- REARDON, C. et al. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 4, p. 1410–1415, 22 jan. 2013. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1221655110>>.
- REARDON, C. et al. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 4, p. 1410–1415, 22 jan. 2013. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1221655110>>.
- REBOLDI, A. et al. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer’s patches. **Science**, v. 352, n. 6287, 13 maio 2016. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaf4822>>.
- REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 11, p. 633–643, 11 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrendo.2017.90>>.
- REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. History and mechanisms of oral tolerance. **Seminars in**

Immunology, v. 30, p. 3–11, abr. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532316300768>>.

ROBERTS, L. B. et al. Acetylcholine production by group 2 innate lymphoid cells promotes mucosal immunity to helminths. **Science Immunology**, v. 6, n. 57, 4 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abd0359>>.

ROSAS-BALLINA, M.; OLOFSSON, P. S.; OCHANI, M.; VALDÉS-FERRER, S. I.; LEVINE, Y. A. et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98–101, 7 out. 2011. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1209985>>.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3 + regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 27, p. 12204–12209, 6 jul. 2010. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0909122107>>.

RUAN, W.; ENGEVIK, M. A.; SPINLER, J. K.; VERSALOVIC, J. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 65, n. 3, p. 695–705, 18 mar. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10620-020-06118-4>>.

RUBTSOV, Y. P. et al. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 546–558, abr. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761308001131>>.

SATITSUKSANOVA, P. et al. Regulatory Immune Mechanisms in Tolerance to Food Allergy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 12 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02939/full>>.

SCHIERING, C. et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 564–568, 16 set. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature13577>>.

SCHLITZER, A. et al. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 970–983, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313002057>>.

SCHROEDER, B. O.; BÄCKHED, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. **Nature Medicine**, v. 22, n. 10, p. 1079–1089, 6 out. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm.4185>>.

SHIELDS, R. W. Functional Anatomy of the Autonomic Nervous System. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 10, n. 1, p. 2–13, jan. 1993. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00004691-199301000-00002>>.

SOMMER, F. et al. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 630–638, 19 out. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.58>>.

SPENCER, J.; SOLLID, L. M. The human intestinal B-cell response. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1113–1124, set. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1933021922007590>>.

STEFFEN, U. et al. IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 120, 8 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-13992-8>>.

SUN, C.-M. et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1775–1785, 6 ago. 2007. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/204/8/1775/46985/Small-intestine-lamina-propria-dendritic-cells>>.

SURYANARAYANAN, A. Acetylcholine. *In*: **Encyclopedia of Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 49–50.

TANSEY, E. M. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, n. 5–6, p. 419–425, maio 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631069106000485>>.

TAYLOR, S. et al. PD-1 regulates KLRG1+ group 2 innate lymphoid cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 6, p. 1663–1678, 5 jun. 2017. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/214/6/1663/42375/PD1-regulates-KLRG1-group-2-innate-lymphoid>>.

TCHKONIA, T. et al. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 644–656, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413113001113>>.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–859, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature01321>>.

TRACEY, K. J. Fat meets the cholinergic antiinflammatory pathway. **Journal of**

Experimental Medicine, v. 202, n. 8, p. 1017–1021, 17 out. 2005. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/202/8/1017/52927/Fat-meets-the-cholinergic-antiinflammatory-pathway>>.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 329–339, 5 ago. 2001. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665101000362/type/journal_article>.

VAISHNAVA, S. et al. The Antibacterial Lectin RegIII γ Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. **Science**, v. 334, n. 6053, p. 255–258, 14 out. 2011. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1209791>>.

VAN OERS, N. S. et al. CD8 inhibits signal transduction through the T cell receptor in CD4-CD8- thymocytes from T cell receptor transgenic mice reconstituted with a transgenic CD8 alpha molecule. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 2, p. 777–790, 15 jul. 1993. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/151/2/777/43516/CD8-inhibits-signal-transduction-through-the-T>>.

VAN NIMWEGEN, F. A. et al. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 5, p. 948–955.e3, nov. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674911011481>>.

VERNOCCI, P.; DEL CHIERICO, F.; PUTIGNANI, L. Gut Microbiota Metabolism and Interaction with Food Components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3688, 23 maio 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/10/3688>>.

VILLARROYA, F. et al. Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 954–961, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413118302481>>.

WEHRWEIN, E. A.; ORER, H. S.; BARMAN, S. M. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *In*: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2016. p. 1239–1278.

WEI, M. et al. Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 264–270, 23 mar. 2011. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/ni.1991>>.

WESSLER, I. et al. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 3, p. 198–205, 27 mar. 1999. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1440-1681.1999.03016.x>>.

WORTHINGTON, J. J.; REIMANN, F.; GRIBBLE, F. M. Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 1, p. 3–20, jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1933021922004846>>.

YANG, W. et al. Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4457, 8 set. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-020-18262-6>>.

ZDANOWSKI, R. et al. Role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. **Central European Journal of Immunology**, v. 3, p. 373–379, 2015. Disponível em: <<http://www.termedia.pl/doi/10.5114/ceji.2015.54602>>.

ZHANG, X. et al. Mesenchymal stromal cells alleviate acute respiratory distress syndrome through the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 307, 5 set. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41392-022-01124-6>>.

ZIHNI, C.; MILLS, C.; MATTER, K.; BALDA, M. S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 564–580, 29 set. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm.2016.80>>.

ZOUALI, M. B lymphocytes, the gastrointestinal tract and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 20, n. 4, p. 102777, abr. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997221000409>>.

ZWICK, R. K. et al. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 68–83, jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155041311730712X>>.