

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas

JAQUELINE MARQUES SANTOS

**INFLUÊNCIA DE DIETA DESBALANCEADA HIPOPROTEICA NA
IMUNIDADE TECIDO-ESPECÍFICA DA MUCOSA INTESTINAL**

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.

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas

JAQUELINE MARQUES SANTOS

**INFLUÊNCIA DE DIETA DESBALANCEADA HIPOPROTEICA NA
IMUNIDADE TECIDO-ESPECÍFICA DA MUCOSA INTESTINAL**

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

2020

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)

Marques Santos, Jaqueline

Influência de dieta desbalanceada hipoproteica
na imunidade tecido-específica da mucosa intestinal
/ Jaqueline Marques Santos; orientador Denise
Morais da Fonseca. -- São Paulo, 2020.

112 p.

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

1. Dieta hipoproteica . 2. Mucosa intestinal. 3.
Infecção. 4. Microbiota. 5. Tolerância oral. I.
Morais da Fonseca, Denise, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Jaqueline Marques Santos

Título da Dissertação: **Influência de dieta desbalanceada hipoproteica na imunidade tecido-específica da mucosa intestinal**

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

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

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

- Departamento: *Imunologia*

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

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

CERTIFICATE

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

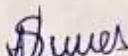
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Denise Moraes da Fonseca**

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

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

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

São Paulo, 16 de junho de 2016.


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


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



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.2.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **49/2016/CEUA**, válido até 14/06/2020, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Denise Moraes da Fonseca**, do Departamento de **Imunologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Jaqueline Marques Santos** ao Projeto de Pesquisa "*Cicatriz Imunológica' pós-infecção intestinal aguda e desenvolvimento de desordens metabólicas: estudo das interações entre a microbiota e sistema imunológico do mesentério*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 02 de fevereiro de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

*Que esse trabalho glorifique ao meu Deus,
autor e consumidor da minha fé.
Dedico também aos meus pais,
João Moura e Orenildes Moreira,
pelo amor, proteção e dedicação,
e a cada uma das pessoas amadas
que acompanham a minha caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, a minha rocha e segurança, por toda sabedoria e graça que vem do alto, e por me fortalecer nos momentos de dificuldade.

Aos meus amados pais, **João Moura e Orenildes Moreira**, e **irmãos**, por todo carinho, compreensão, apoio emocional e financeiro durante esse período. Vocês são o meu alicerce.

Ao meu companheiro de todas as horas, **Anderson Antunes**, por sempre estar ao meu lado, e por tornar a caminhada bem mais prazerosa.

À minha amiga, **Thalita Paranhos**, por acreditar em mim e me incentivar a perseguir os meus sonhos.

À minha orientadora, **Dra. Denise Morais da Fonseca**, pela oportunidade e apoio durante o desenvolvimento de todo o projeto. Pelo companheirismo e paciência em todos os experimentos. E sobretudo, pelos ensinamentos, me possibilitando crescer profissionalmente.

Às antigas companheiras (amigas) de laboratório, **Dra. Marcela Davoli e Ma. Mirian Krystel de Siqueira**, por transformarem o laboratório em um lar, com todo companheirismo, generosidade, alegria, e por todos os ensinamentos, desde as técnicas básicas até as mais complexas.

Ao grande time (como diria o Caio) do **Laboratório de Imunologia de Mucosas**, principalmente às alunas **Bela. Bárbara Pizzolante, Ma. Marina Ayupe**, por estarem sempre tão presentes, no meu trabalho e na minha vida, mostrando que o laboratório é muito mais que um lugar onde se faz e discute ciência; e a **Bela. Luísa Menezes Silva** (Lulita), que esteve comigo desde o início da caminhada, compartilhando momentos felizes e tristes, e ao **Me. Caio Loureiro**, por todo auxílio nos experimentos, análises e pelo companheirismo diário.

Também agradeço aos alunos, **Bernardo de Castro Oliveira, Maria Tereza Martinez e Leonardo Mandu**. Foi um prazer conviver com vocês e espero que essa paixão por novas descobertas nunca se apague.

Agradeço imensamente o auxílio do **Dr. Walter Miguel Turato** nas análises dos tecidos ósseo e adiposo periférico. E por sua disponibilidade e simpatia.

Ao **Prof. Dr. Momtchilo Russo, Dr. Ricardo Alberca Custódio, e Bela. Eliane Gomes** pela gentileza em nos permitir usar seu laboratório e pelo apoio científico e técnico durante os experimentos.

Ao **Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes, e a Ma. Josiani Betim** pelos momentos científicos, por toda a atenção e disponibilidade e também por ter me permitido usar o seu laboratório como uma segunda “casa”.

Aos meus queridos amigos do andar superior, **Bruna, Débora, Paulo, Gislane e Joaquim**, por todo companheirismo nas disciplinas, trabalhos e discussões. Pessoas encantadoras, capazes de arrancar as maiores gargalhadas e de trazer sol para os momentos mais chuvosos. Sempre que eu precisar citar as maravilhas do convívio na pós-graduação, o nome de vocês estará lá.

Aos baianos da microbiologia e parasitologia, **Alexia, Bianca, Naty, Lennon e Samuel**. Mais que colegas da pós-graduação, amigos, companheiros, inspirações que carrego desde a graduação. Os biomédicos que ensinaram a enfermeira a se apaixonar pela pesquisa.

Aos amigos, irmãos em Cristo, e familiares de perto e de longe, que se fazem presentes por meio de orações, conselhos e que sempre estão tão dispostos a ouvir.

Agradeço também à equipe do **CEFAP**, pelo auxílio nos experimentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Imunologia.

Aos colegas de pós-graduação pelo convívio e pela troca de experiências e aprendizados.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado sob orientação da Prof.^a Dr.^a Denise Morais da Fonseca, no Laboratório de Imunologia de Mucosas (LabIM), no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro dos processos nº 2015/25364-0 e 2018/00458-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Grandes são as obras do Senhor, dignas de estudo para quem as ama.

Salmos 111.2

RESUMO

SANTOS, J. M. **Influência de dieta desbalanceada hipoproteica na imunidade tecido-específica da mucosa intestinal**. 2020. 112p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A manutenção da homeostase nos tecidos de mucosa requer a presença de uma rede de mecanismos imunológicos tecido-específicos que possuem a capacidade de manter a tolerância a antígenos inócuos ambientais e, ao mesmo tempo, induzir respostas efetoras eficientes para prevenir a invasão por patógenos. No intestino, em particular, diversos elementos mantêm interações bidimensionais para a manutenção destas respostas imunes homeostáticas tecido-específicas, incluindo a microbiota residente e componentes da dieta alimentar. No entanto, microrganismos (comensais, patobiontes e patógenos) e fatores ambientais, como a dieta (pré-bióticos, suplementos ou nutrientes), podem causar a quebra da homeostase intestinal. Alterações na dieta, por exemplo, pode promover mudanças na microbiota comensal, acarretando alteração da resposta imune local. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de uma dieta desbalanceada baseada em carboidratos e deficiente em proteínas e lipídeos (que vamos chamar de dieta hipoproteica) na homeostase imunológica intestinal tecido-específica. Para este estudo, camundongos C57BL/6 foram tratados com a dieta hipoproteica *ad libitum* durante 6 semanas para avaliação do infiltrado celular na lâmina própria. Os resultados obtidos mostram que o uso de uma dieta hipoproteica, embora não acarrete um quadro de comprometimento significativo, desnutrição ou déficit do desenvolvimento corpóreo do animal, parece alterar a homeostase da mucosa intestinal. Esta alteração foi mais evidente na porção proximal do intestino delgado e foi caracterizada por aumento da presença de um subtipo de DC associado às respostas canônicas intestinais (CD103⁺CD11b⁺), assim como aumento da presença de células Treg, Th17 e células associadas a uma resposta do tipo 2 (Eosinófilos, ILC2 e macrófagos M2). Além disso, a dieta estava associada a uma redução de populações celulares de caráter mais inflamatório, como neutrófilos, monócitos, macrófagos M1, ILC3 e células Th1. Para avaliar o impacto funcional destas alterações, os camundongos foram infectados com um inóculo subclínico da bactéria *Yersinia pseudotuberculosis* que não causou doença nos animais alimentados com a dieta controle, mas levou ao déficit de crescimento e desenvolvimento de processo inflamatório crônico na mucosa intestinal. Este efeito não foi dependente da presença de infecção ativa e nem da microbiota alterada pela infecção. Além do comprometimento das respostas contra antígenos de origem infecciosa, o tratamento com a dieta também afetou a maneira como o animal respondeu a antígenos de origem alimentar. Animais tratados com a dieta hipoproteica, quando expostos a Ovalbumina (OVA) pela via oral, exibiram a ativação de linfócitos T específicos para OVA de padrão Treg, Th17 e Th2, ao contrário do grupo controle onde existiu uma polarização exclusiva para um perfil de Tregs. Em conjunto, estes resultados mostram que o uso de uma dieta desbalanceada, mesmo que não cause um quadro de desnutrição aparente, pode levar ao comprometimento da ativação adequada da resposta imune tecido-específica da mucosa intestinal e desenvolvimento de doenças sistêmicas.

Palavras-Chave: Dieta Hipoproteica, Mucosa Intestinal, Infecção, Microbiota, Tolerância oral

ABSTRACT

SANTOS, J. M. **Local and systemic effects of low-protein unbalanced diets in the gut-mucosa tissue-specific immunity.** 2020. 112p. Master's thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Maintaining homeostasis in mucosal tissues requires the presence of a network of tissue-specific immune mechanisms endowed with the ability to maintain tolerance to environmental antigens and, at the same time, to induce efficient effector responses to prevent invasion by pathogens. In the intestine, in particular, several elements maintain bi-dimensional interactions to maintain the tissue-specific immunity, including the resident microbiota and components of the diet. However, microorganisms (commensals, pathobionts and pathogens) and environmental factors, such as diet (prebiotics, supplements or nutrients), can cause the breakdown of intestinal immune-homeostasis. For instance, changes in diet can modify the composition of commensal microbiota, impacting on the local immune response. Thus, this study aimed to evaluate the effects of an unbalanced diet based on carbohydrates and deficient in proteins and lipids (which we will call a low-protein diet) in tissue-specific intestinal immune homeostasis. For this study, C57BL/6 mice were treated with a low-protein diet ad libitum for 6 weeks to assess the cellular infiltrate in the lamina propria. The results obtained show that the treatment with a low-protein diet, although it seems not to result in significant malnutrition or deficit in the animal's body development, seems to alter the intestinal mucosal homeostasis. This change was more evident in the proximal portion of the small intestine and was characterized by an increase in the presence of DC subsets associated with canonical intestinal responses (CD103+ CD11b+), as well as an increase in the presence of Treg and Th17 cells in parallel with a type 2 innate cell infiltration (Eosinophils, ILC2 and M2 macrophages). In addition, the diet was associated with a reduction in cell populations of a more inflammatory character, such as neutrophils, monocytes, M1 macrophages, ILC3 and Th1 cells. To assess the functional impact of such changes, mice were infected with a subclinical inoculum of the bacterium *Yersinia pseudotuberculosis* that did not cause disease in animals fed the control diet, but led to deficit in growth and development of a chronic inflammatory process in the gut mucosa. This effect was not dependent nor on the presence of active infection or the microbiota altered by the infection. In addition to the impaired responses to infectious antigens, treatment with the diet also affected responses to food-borne antigens. Animals treated with the low protein diet, when exposed to oral Ovalbumin (OVA), exhibited activation of specific T lymphocytes for OVA of the Treg, Th17 and Th2 pattern, unlike the control group where there was an exclusive polarization for a Treg profile. Together, these results show that the use of an unbalanced diet, even if it does not cause an apparent malnutrition, can lead to impaired activation of the tissue-specific immune response of the intestinal mucosa and the development of systemic diseases.

Keywords: Low-Protein Diet, Gut Mucosa, Infection, Microbiota, Oral Tolerance

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Esquema representativo do sistema imunológico associado à mucosa gastrointestinal.....	21
Figura 2: Relação entre as propriedades da barreira epitelial do intestino e o processo inflamatório.....	29
Figura 3: Etapas utilizadas por espécies de <i>Yersinia</i> enteropatogênicas para translocação do epitélio intestinal e desenvolvimento do processo infeccioso que leva à linfadenite mesentérica.....	30
Figura 4: Análise “t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE).....	44
Figura 5: Avaliação do crescimento e desenvolvimento corporal de animais submetidos à dieta hipoproteica.....	49
Figura 6: Remodelamento dos compartimentos de tecido adiposo após alteração na dieta.....	50
Figura 7: Alterações nos parâmetros hematológicos pós-ingestão de dieta com baixa quantidade de proteínas.	52
Figura 8: Análise do infiltrado de células mieloides da lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica.....	53
Figura 9: Análise do infiltrado de células mieloides da lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica.....	55
Figura10: Análise do infiltrado de células linfoides na lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica.....	56
Figura 11: Remodelamento das vilosidades do intestino delgado após a alteração na dieta.....	58
Figura 12: Influência do tratamento com dieta hipoproteica sobre o infiltrado celular da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado.....	59
Figura 13: Análise do infiltrado de leucócitos na lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de animais tratados com dieta hipoproteica.....	63
Figura 14: Análise do infiltrado de células linfoides da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com dieta hipoproteica.....	65
Figura 15: Análise do infiltrado linfoide adaptativo da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com dieta hipoproteica.....	67

Figura 16: Análise do infiltrado linfoide inato da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com dieta hipoproteica.....	68
Figura 17: Análise da produção de citocinas por leucócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino de animais tratados com dieta hipoproteica.....	69
Figura 18: Análise da produção de citocinas por linfócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino de animais tratados com dieta hipoproteica.....	70
Figura 19: Produção muco nas porções proximais e distais do intestino delgado após a alteração na dieta.....	71
Figura 20: Sobrevida de animais submetidos à dieta hipoproteica na presença de infecção aguda da mucosa intestinal.....	72
Figura 21: Avaliação do crescimento, desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal de animais submetidos à dieta hipoproteica e infectados com <i>Y. pseudotuberculosis</i>	74
Figura 22: Avaliação das alterações estruturais na porção distal do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica pós infecção.....	76
Figura 23: Análise do infiltrado de leucócitos da lâmina própria do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção subclínica recorrente.....	78
Figura 24: Análise do infiltrado de leucócitos da imunidade inata na lâmina própria do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção subclínica.....	80
Figura 25: Análise do infiltrado de células linfoides na lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção.....	82
Figura 26: Análise do infiltrado linfoide da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção.....	83
Figura 27: Análise da produção de citocinas por linfócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção.....	85
Figura 28: Avaliação da presença de infecção ativa e de translocação bacteriana em camundongos submetidos à dieta hipoproteica e posteriormente infectados com <i>Y. pseudotuberculosis</i>	86

Figura 29: Avaliação do crescimento, desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal de animais que receberam transplante fecal de camundongos previamente infectados com *Y. pseudotuberculosis* e submetidos à dieta hipoproteica.....**89**

Figura 30: Avaliação da presença contra antígenos alimentares em animais tratados com dieta hipoproteica.....**92**

Tabela 1. Principais componentes das dietas controle e hipoproteica.**37**

Tabela 2. Anticorpos monoclonais utilizados.....**42**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem

°C: graus celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

AUC: Área Sob a Curva (do inglês, *Area Under the Curve*)

BHI: do inglês, *Brain Heart Infusion*

CD: do inglês, *Custer Differentiation*

CD: Doença de Crohn (do inglês, *Crohn's Disease*)

CEFAP: Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa

CG: Centro Germinativo do folículo linfóide

CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (concentração RDW-CV – Coeficiente de Variação da Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos)

DC: Célula Dendrítica (do inglês, *Dendritic Cell*)

EE: do inglês, *Environmental Enteropathy*

ETBF: do inglês, *Enterotoxigenic Fragilis Bacteroides*

FMT: Transplante de Matéria Fecal (do inglês, *Fecal Matter Transplantation*)

GALT: Tecido Linfóide Associado ao Intestino (do inglês, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*)

h: hora

HBSS: do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*

HCT: Hematócrito

HE: Hematoxilina e Eosina

HGB: Hemoglobina

IFN-γ: *Interferon-gama*

IL-1: Interleucina-1

IL-13: Interleucina-13

IL-17: Interleucina-17

IL-22: Interleucina-22

IL-4: Interleucina-4

IL-5: Interleucina-5

ILC: Célula Linfóide Inata (do inglês, *Innate Lymphoid Cell*)

ILC1: Célula Linfóide Inata Tipo 1 (do inglês, *Type 1 Innate Lymphoid Cell*)

ILC2: Célula Linfóide Inata Tipo 2 (do inglês, *Type 2 Innate Lymphoid Cell*)
ILC3: Célula Linfóide Inata Tipo 3 (do inglês, *Type 3 Innate Lymphoid Cell*)
LB: Linfócito B
LT: Linfócito T
LTi: Célula Indutora de Tecido Linfóide (do inglês, *Lymphoid Tissue Inducer cell*)
MCH: Hemoglobina Corpuscular Média (do inglês, *Mean Corpuscular Hemoglobin*)
MCV: Volume Corpuscular Médio (do inglês, *Mean Corpuscular Volume*)
mesAT: Tecido Adiposo Mesentérico (do inglês, *mesenteric Adipose Tissue*)
min: minutos
mLN: Linfonodo Mesentérico (do inglês, *Mesenteric Lymph Node*)
MPV: Volume Plaquetário Médio (do inglês, *Mean Platelet Volume*)
MUC2: mucina 2
NCR: Receptor de Citotoxicidade Natural (do inglês, *Natural Cytotoxicity Receptor*)
NTBF: do inglês, *Non-toxigenic Bacteroides fragilis*
OVA: Ovoalbumina
PAS: Reativo Periódico de Schiff (do inglês, *Periodic Acid of Schiff*)
PBS: Tampão Fosfato Salino (do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*)
PCT: Plaquetócrito
PDW: Amplitude da Distribuição de Plaquetas (do inglês, *Platelet Distribution Width*)
PLT: Plaquetas
PMA: do inglês, *Phorbol Myristate Acetate*
PP: Placas de Peyer
prgAT: Tecido Adiposo Perigonadal (do inglês, *perigonadal Adipose Tissue*)
RBC: Glóbulos Vermelhos ou Eritrócitos (do inglês, *Red Blood Cells*)
RDW: Desvio Padrão da Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (do inglês, *Red Cell Distribution Width High*)
rpm: rotações por minuto
RPMI: do inglês, *Roswell Park Memorial Institute Medium*
scAT: Tecido Adiposo Subcutâneo (do inglês, *subcutaneous Adipose Tissue*)
SFB: Soro Fetal Bovino
SPF: Animais Livres de Patógenos Específicos (do inglês, *Specific pathogen-Free*)
TGI: Trato Gastrointestinal
Th: Linfócitos T Helper
TLR: Receptores Semelhantes a Toll (do inglês, *Toll-Like Receptors*)

TNF: Fator de Necrose Tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)

Treg: Linfócito T Regulador (do inglês, *Regulatory T cell*)

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

WBC: Leucócitos (do inglês, *White Blood cells*)

YOPs: do inglês, *Yersinia Outer Proteins*

YP: *Yersinia pseudotuberculosis*

ZM: Zona Marginal Do Folículo Linfóide

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	14
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Imunologia da mucosa gastrointestinal	20
1.2 Interação entre a dieta hipoproteica, a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro	24
1.3 Infecções intestinais e sua contribuição para a ruptura da homeostase imunológica e metabólica nas mucosas.....	27
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Camundongos.....	37
3.2 Dietas Especiais.....	37
3.3 Pesagem semanal	37
3.4 Infecção Oral.....	38
3.5 Transplante de conteúdo fecal	38
3.6 Avaliação do desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal ...	38
3.7 Histologia	39
3.8 Obtenção de células do intestino	39
3.9 Marcação de células para análise fenotípica e funcional por citometria de fluxo	40
3.10 Anticorpos utilizados	42
3.11 Estratégias de análise dos resultados de citometria de fluxo.....	42
3.12 Análise de tSNE	43
3.13 Translocação bacteriana.....	44
3.14 Hemograma	45
3.15 Transferência celular e marcação com Cell Tracer Violet.....	45
3.16 Ensaio de rastreamento da resposta específica para antígenos orais	46
3.17 Análise estatística	46
4. RESULTADOS	48
4.1 Efeito da dieta hipoproteica no crescimento e desenvolvimento dos animais..	48

4.2	Influência da dieta hipoproteica nas células presentes na circulação sanguínea	51
4.3	Efeito da dieta hipoproteica na imunidade da mucosa intestinal.....	52
4.4	Impacto da dieta hipoproteica nas diferentes porções do intestino delgado	57
4.5	Influência da dieta sobre a progressão de infecção intestinal aguda	72
4.6	Impacto no crescimento e desenvolvimento corporal dos animais tratados com dieta hipoproteica após infecção gastrointestinal.....	73
4.7	Alterações estruturais no intestino delgado após a eliminação da infecção subclínica em camundongos submetidos à dieta desbalanceada	75
4.8	Caracterização do infiltrado de inflamatório nas porções proximais e distais do intestino delgado pós-infecção em um contexto de dieta desbalanceada	77
4.9	As alterações na estrutura intestinal após alteração na dieta e infecção por <i>Y. pseudotuberculosis</i> não são consequências de uma infecção ativa	86
4.10	Influência da microbiota modificada por episódios de infecção gastrointestinal sobre o crescimento e desenvolvimento de camundongos submetidos à dieta hipoproteica	87
4.11	Influência da dieta hipoproteica sobre a resposta específica para antígenos alimentares	90
5.	DISCUSSÃO	94
6.	CONCLUSÃO.....	103
7.	BIBLIOGRAFIA	105

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Imunologia da mucosa gastrointestinal

A manutenção da homeostase em órgãos de alta exposição antigênica, como a pele, o pulmão e a mucosa gastrointestinal, requer a existência de um sistema imunológico altamente especializado, que permita ao hospedeiro estabelecer uma relação de mutualismo com a microbiota residente e, ao mesmo tempo, induzir imunidade contra patógenos (LI, Y. et al, 2020; DAVID, R.S.L. et al, 2020).

O trato gastrointestinal, especificamente, é constantemente desafiado pelos conteúdos luminais que abrigam inúmeros microrganismos e antígenos alimentares. Para manter o equilíbrio homeostático, é fundamental que o sistema imunológico local seja capaz de identificar se os estímulos recebidos estão relacionados a uma quebra de homeostase ou não e de elaborar uma resposta adequada, resultando em um processo de inflamação ou de tolerância (RAPOZO et al. 2017).

Em condições de homeostase em indivíduos saudáveis diversos mecanismos de imunidade de barreira atuam para conter a proliferação exacerbada dos componentes da microbiota intestinal, a entrada de patógenos e prevenir lesão tecidual causada por ativação excessiva do sistema imune (**Figura 1**). Tais mecanismos incluem: a produção de muco, presença de junções intraepiteliais que impedem a translocação de bactérias, produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas e anticorpos (TURNER, 2009, MARCHIANDO, G. et al. 2010, MARCHIANDO, S. et al. 2010, BELKAID; HAND, 2014).

O tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT - do inglês, *Gastrointestinal Associated Lymphoid Tissue*) pode ser dividido em locais efetores dispersos, como a lâmina própria e os linfócitos intraepiteliais, e estruturas linfoides organizadas, como linfonodos mesentéricos (mLNs - do inglês, *Mesenteric Lymph Nodes*), placas de Peyer (PPs) e os folículos linfoides isolados. Estas estruturas organizadas no trato gastrointestinal desempenham o papel de órgãos linfoides secundários, envolvidos na indução da resposta imunológica da mucosa (SCHENK, M., 2008).

O sistema imunológico associado à mucosa intestinal e ao mesentério possui ainda um componente importante formado por uma rede complexa de células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, do inglês, *Dendritic Cells - DCs*) e

vasos linfáticos coletores responsáveis pelo transporte de antígenos e células para órgãos linfoides secundários onde são elaboradas as respostas imunes adaptativas efetoras e tolerogênicas (MACPHERSON; UHR, 2004, MACPHERSON; UHR, 2004, HAMMERSCHMIDT, A. et al. 2008, CONG, F. et al. 2009, IVANOV, A. et al. 2009, MACPHERSON, S. et al. 2009, FONSECA; HAND et al. 2015).

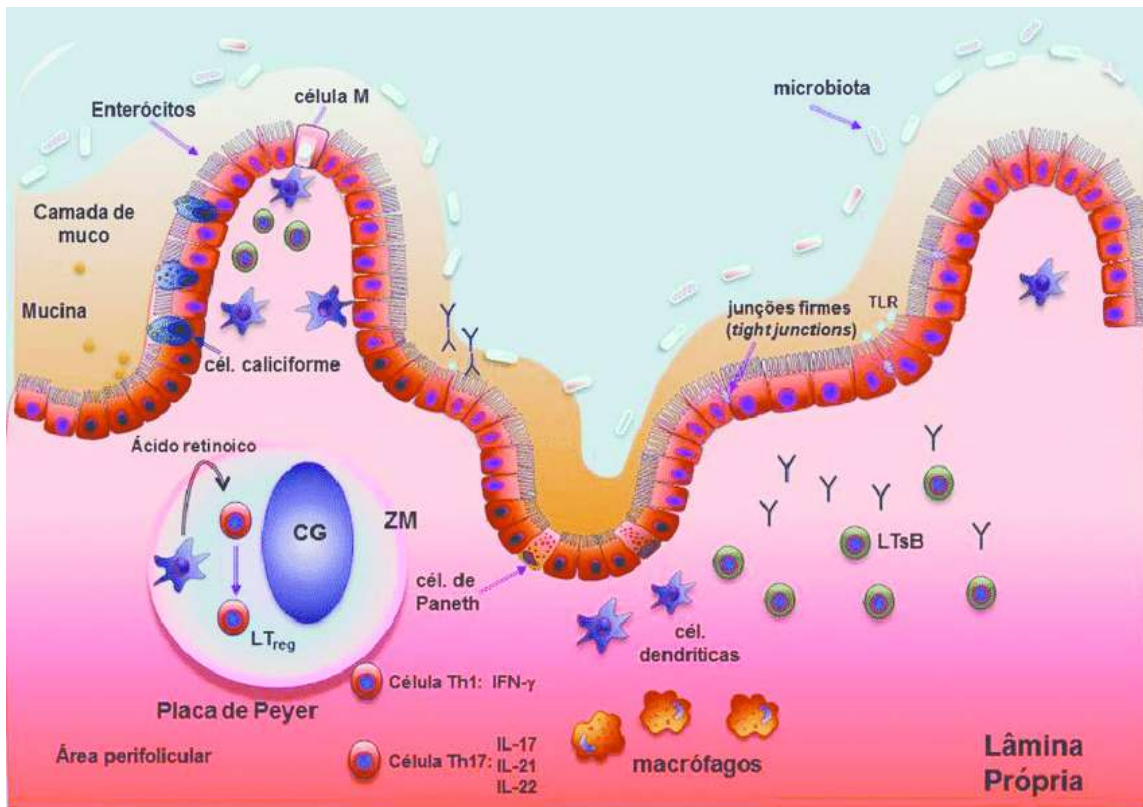


Figura 1: Esquema representativo do sistema imunológico associado à mucosa gastrointestinal. Modificado de GONÇALVES, J. et al, 2016. Arranjo nodular encapsulado da placa de Peyer. Epitélio intestinal, composto por enterócitos organizados e unidos pelas junções de oclusão ou tight junctions, formando uma barreira contra a translocação de microrganismos do lúmen para a lâmina própria. Expressão de receptores TLR (do inglês, *toll-like receptors*) e presença de células caliciformes no epitélio intestinal, que também compõem a barreira paracelular. Camada de muco e de peptídeos antimicrobianos responsáveis por restringir a translocação de microrganismos. Linfócitos B (LTsB) e T, incluindo linfócitos polarizados para respostas Th1 e Th17 e suas respectivas citocinas na lâmina própria. Células M, que desempenham um papel importante no transporte de antígenos não processados para células dendríticas e linfócitos da lâmina própria. Macrófagos e células dendríticas, apresentadoras de antígenos, que também se encontram dispersos na lâmina própria. Linfócitos T reguladores (LTreg), encontrados principalmente nas placas de Peyer e induzidos pela presença do ácido retinóico e da citocina TGF- β . CG=centro germinativo do folículo linfoide; ZM= zona marginal do folículo linfoide.

Acredita-se que as DCs intestinais sejam principalmente derivadas de precursores da medula óssea comprometidos com a diferenciação dessas células e também por monócitos que podem migrar para a mucosa, por meio de gradientes de quimiocina, e diferenciar-se em DCs no tecido. As DCs são encontradas tanto nas

placas de Peyer, onde podem acessar antígenos transportados através das células M e dispersas por todo o trato gastrointestinal, onde foi relatado que, pelo menos no íleo terminal, podem modular a expressão das proteínas de junção intercelulares no epitélio para obter acesso por meio dos seus dendritos, ao lúmen intestinal (GONÇALVES, J. et al, 2016).

Os diferentes subtipos de DCs podem ser descritos com base na expressão das integrinas CD11b e CD103. Na lâmina própria intestinal, encontramos DCs CD11b⁺CD103⁻, CD11b⁻CD103⁺ e CD11b⁺CD103⁺. As funções destes diferentes subtipos celulares estão diretamente relacionadas com o microambiente celular, que pode diferenciá-los como subtipos mais tolerogênicos ou inflamatórios. Estudos demonstram que as DCs CD11b⁺CD103⁺ estão intimamente envolvidas na manutenção da homeostase intestinal, principalmente por meio da síntese de ácido retinóico e TGF- β , induzindo a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em linfócitos T reguladores (Tregs) e Th17, bem como a produção de IgA pelos plasmócitos, tanto de maneira T-dependente como T-independente (JOERIS, T. et al, 2017; VAROL, C. et al, 2009; OWEN, J.L, 2013).

As DCs que expressam CD103 são capazes de emitir prolongamentos pelo epitélio intestinal, capturando antígenos. Além disso, estas células possuem relação com a tolerância a microrganismos comensais por sua capacidade de induzir Tregs (OWEN, J.L, 2013; RESCIGNO, M., 2010). Quanto às células CD11b⁻CD103⁺, alguns estudos descrevem a sua capacidade de induzir a resposta Th17, que no intestino, pode estar relacionada com o aumento da secreção de peptídeos antimicrobianos, reforço da barreira epitelial, indução de respostas neutrofílicas, dentre outros, dependendo do microambiente tecidual (ATARASHI, K., 2010; UEMATSU, S. 2008).

A lâmina própria também conta com macrófagos, localizados na região subepitelial. Microrganismos comensais e patógenos que ocasionalmente obtêm acesso à lâmina própria são rapidamente fagocitados por esses macrófagos, posicionados preferencialmente nos locais de entrada do antígeno. Apesar da proximidade entre antígenos luminiais e macrófagos intestinais, a mucosa intestinal normalmente exhibe sinais mínimos de inflamação (SCHENK, M., 2008). Grande parte dessa tolerância se deve à natureza dos macrófagos residentes da mucosa, que não possuem caráter inflamatório.

Para que as respostas imunológicas sejam desencadeadas na lâmina própria, é necessário que o antígeno seja apresentado às células T que serão posteriormente ativadas. As células M figuram entre os vários mecanismos de transporte de antígenos luminiais. Estas células são enterócitos modificados, localizados no epitélio intestinal associado às placas de Peyer, principalmente na porção distal do intestino delgado. Elas formam bolsos na camada epitelial permitindo o contato do antígeno com DCs, macrófagos e linfócitos B, e a apresentação do mesmo para os linfócitos T (DILLON, A; LO, D.D, 2019). De acordo com a natureza do antígeno, o tipo de célula a qual o antígeno é apresentado e com o microambiente onde o mesmo se encontra, pode ser desencadeada uma resposta imunológica inflamatória ou tolerogênica.

Além disso, a composição da microbiota intestinal, por sua vez, também molda o sistema imunológico inato e adaptativo da mucosa. O desenvolvimento e a adaptação da microbiota intestinal representam um processo contínuo que ocorre ao longo da vida. A este respeito, vários fatores ambientais contribuem para a colonização microbiana do trato gastrointestinal, como alimentação, higiene, estresse e uso de medicamentos (HAND, T.W., 2016).

A composição da microbiota intestinal é afetada desde muito cedo na vida, começando com a via de parto. Pouco depois do nascimento, a amamentação, a exposição a alimentos e outros fatores ambientais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da microbiota intestinal. A microbiota comensal é distribuída em todo o trato gastrointestinal, com um aumento característico e progressivo tanto da diversidade quanto da densidade dos segmentos superiores aos inferiores (DOMINGUEZ-BELLO et al, 2011; MARTIN et al, 2010). Estudos do microbioma humano identificaram mais de 3 milhões de genes únicos dentro do intestino, superando amplamente o genoma humano e contendo mais de mil espécies bacterianas, sendo a maioria dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (ZHU et al, 2010; ARUMUGAM et al, 2011).

Após o estabelecimento da microbiota comensal, fatores intrínsecos (como componentes genéticos) e extrínsecos (fatores ambientais) podem atuar sobre a sua composição, moldando o sistema imunológico residente da mucosa e consequentemente levando a condições de homeostase ou disbiose intestinal.

1.2 Interação entre a dieta hipoproteica, a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro

Atualmente foram demonstradas diversas evidências da existência de uma relação cruzada entre o hospedeiro e a microbiota comensal do intestino. Os nutrientes desempenham um papel importante nesta relação, de forma direta, interagindo com o hospedeiro através do epitélio ou do sistema imunológico intestinal, ou indiretamente, modulando a composição da microbiota comensal que, por sua vez, irá interagir com o sistema imunológico e *vice-versa* (MA, N. et al, 2017).

O sistema imunológico intestinal, quando em contato com diferentes tipos de microrganismos e nutrientes, pode reagir ou adaptar-se. O tipo de resposta (inflamatória ou tolerogênica) está diretamente relacionada com a natureza do microrganismo (comensais, patobiontes e patógenos), mas também a fatores ambientais, como a dieta (pré-bióticos, suplementos ou nutrientes) (STATOVCI, D. et al, 2017).

Com relação aos macronutrientes da dieta, as proteínas são essenciais para o organismo e estão envolvidas em praticamente todas as funções fisiológicas. Vários estudos demonstram que peptídeos e aminoácidos presentes na dieta podem modular as funções imunes intestinais e influenciar nas respostas inflamatórias (LI, Z. et al, 2016). A ingestão de altas quantidades de proteínas, por exemplo, especialmente de origem animal, está associada a um risco aumentado de Doença de Crohn (CD - do inglês, *Crohn's Disease*). Por outro lado, a suplementação com o dipeptídeo alanina-glutamina leva à diminuição da expressão de mediadores inflamatórios e aumenta a expressão da mucina 2 (MUC2) promovendo a recuperação da mucosa em modelo murino de colite induzida por DSS (do inglês *Dextran Sulfate Sodium- sulfato de sódio dextrano*) (HOU, Y.C. et al, 2013). Outros trabalhos, mostram que a alimentação com dieta baseada em aminoácidos, livre de proteínas, está associada a um estado de imaturidade do sistema imunológico da mucosa intestinal e incapacidade de indução de tolerância nasal a alérgenos aéreos (MENEZES, J. S. et al, 2003; MUCIDA, D.S. et al, 2007)

Além disso, foi mostrado que a diminuição nos níveis de triptofano sérico está associada à patogênese da CD. Complementarmente, a suplementação com triptofano apresentou efeitos benéficos no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por DSS, causando apoptose de células T e inibindo as respostas imunes mediadas por Th1 e conseqüentemente reduzindo a inflamação (KIM, C.J., 2009).

Além dos efeitos na resposta imunológica do hospedeiro, a baixa ingestão de proteínas pode promover mudanças na microbiota intestinal. Estudo de coorte com amostras de microbiota fecal coletadas mensalmente de crianças com fenótipo de crescimento saudável identificou mudanças associadas à idade na representação de espécies bacterianas durante os dois primeiros anos de vida pós-natal. Estas espécies foram incorporadas a um modelo que calcula o "índice de maturidade relativo da microbiota" e "o parâmetro de microbiota relacionada a idade", que comparam o desenvolvimento das crianças com a maturação da microbiota fecal.

Esses dados definem um programa de desenvolvimento de microbiota que é compartilhado entre bebês e crianças de Bangladesh, não relacionados biologicamente. As crianças que habitam nesse local, geralmente são acometidas por desnutrição moderada ou grave e apresentam perturbações na microbiota comensal, resultando em uma imaturidade nas comunidades microbianas. Essa desnutrição se deve principalmente à baixa ingestão proteica relacionada ao fator socioeconômico desfavorável (SUBRAMANIAN et al, 2014).

Um trabalho publicado em 2016, utilizando camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle, hipoproteica ou deficiente em zinco, mostrou mudanças consideráveis da microbiota intestinal entre 14 e 24 dias após o desmame nos camundongos que foram mantidos em dieta controle, incluindo aumento de *Proteobacteria* e redução de *Bacteroidetes*. A microbiota dos camundongos que foram alimentados com a dieta deficiente em zinco foi comparável ao perfil da microbiota de animais nutridos adequadamente e com a mesma idade, já a restrição de proteínas causou uma diminuição do filo *Bacteroidetes* nesses animais (PERXACHS et al, 2016). Além disso, aumento de *Verrucomicrobia* (predominantemente *Akkermansia muciniphila*) foi observado tanto em camundongos nutridos quanto em camundongos que receberam a dieta deficiente em proteínas, 14 dias após o desmame. A desnutrição proteica também prejudicou o crescimento, muito mais do que a deficiência de zinco, e causou alterações energéticas e no metabolismo de poliamina, purinas e pirimidinas dos camundongos (PERXACHS et al, 2016).

Para elucidar as interações entre enteropatógenos e membros da comunidade microbiana do intestino e, como essas interações contribuem para a função absorptiva do epitélio intestinal e desnutrição, um grupo de pesquisadores colonizou camundongos gnotobióticos, alimentados com dietas representativas de Bangladesh,

com cepas bacterianas sequenciadas e cultivadas a partir da microbiota fecal de dois gêmeos de 24 meses de idade, residentes em Bangladesh, um saudável e outro abaixo do peso (WAGNER, et al., 2016). A microbiota do doador com desnutrição proteica continha uma cepa de *Bacteroides fragilis enterotoxigênica* (ETBF - do inglês, *Enterotoxigenic Fragilis Bacteroides*), enquanto a microbiota do doador saudável continha duas cepas não toxigênicas de *B. fragilis* (NTBF - do inglês, *non-toxigenic Bacteroides fragilis*). Análises de camundongos que receberam as culturas não manipuladas ou sistematicamente manipuladas destas cepas revelaram que a ETBF estava relacionada à perda de peso no contexto de desnutrição, mas não quando introduzida na comunidade de doadores saudáveis. A presença de NTBF reduziu a expressão da ETBF e mitigou os efeitos da ETBF quando transferida para membros saudáveis.

Este fenótipo foi transmissível e associado a transtornos no metabolismo do hospedeiro, manifestado por alterações na atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, prejudicando a utilização de acil-CoA (WAGNER, et al., 2016). Portanto, a baixa ingesta proteica, comumente encontrada na população de Bangladesh, é capaz de modular a microbiota comensal do intestino, conseqüentemente interferindo nos processos metabólicos e na resposta imunológica local.

Dentro deste contexto, a interação entre dieta, microbiota e resposta imunológica do hospedeiro é extremamente complexa, principalmente no que se refere ao agravamento das respostas inflamatórias mediante ao consumo excessivo ou à diminuição drástica de certos nutrientes presentes na dieta (STATOVCI, D. et al, 2017).

Além da dieta, diferentes tipos de infecções podem interferir na composição da microbiota intestinal. Estas infecções geralmente são causadas por microrganismos gastrointestinais não comensais e podem ser agudas (autolimitantes) ou crônicas. As espécies bacterianas *Shigella* spp., *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp. são as principais causadoras de doenças em humanos, e dentre as causas de afecções intestinais destaca-se a infecção por *Salmonella* spp. (AHERN, P.P; MALOY, K.J, 2019). Atualmente, vários modelos murinos de infecções gastrointestinais bacterianas estão sendo utilizados para mimetizar os processos envolvidos na resposta imunológica durante a interação hospedeiro-patógeno. No entanto, a resposta do animal nem sempre reproduz a patologia humana, especialmente nos casos de modelo de infecção aguda.

1.3 Infecções intestinais e sua contribuição para a ruptura da homeostase imunológica e metabólica nas mucosas

Infecções intestinais por bactérias, protozoários, fungos, vírus e helmintos são comuns na população mundial e afetam indivíduos de diferentes faixas etárias. Os agentes causadores, a gravidade, o desfecho e a incidência das infecções gastrointestinais estão associadas ao grau de exposição aos agentes patogênicos, ao desenvolvimento socioeconômico e à integridade do sistema imunológico do hospedeiro (SANSONETTI, J.P, 2004).

A homeostase e a integridade tecidual nos tecidos de barreira são mantidas em função da capacidade do sistema imunológico local em reconhecer e processar os sinais ambientais e endógenos para elaborar respostas apropriadas e finamente reguladas contra patógenos. Entretanto, determinadas infecções do trato gastrointestinal ou infecções recorrentes podem levar à quebra da homeostase intestinal, promovendo imunidade contra componentes próprios ou da microbiota e o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (KASER, ZEISSIG et al. 2010, HAND, T.W. et al. 2012, KORPE; PETRI, 2012, KORPE; STOTT et al. 2012, MONDAL, M. et al. 2012).

Infecções gastrointestinais podem ainda interferir na homeostase entre a microbiota-sistema endócrino-sistema imunológico por diferentes vias: indução de disbiose com consequente proliferação exacerbada/oportunística de enterobactérias, indução de imunidade contra microrganismos comensais e indução de alterações morfológicas e estruturais da mucosa intestinal e dos tecidos linfoides associados (HEIMESAAT, B. et al. 2006, LUPP, R. et al. 2007, CRAVEN, E. et al. 2012, HAND, T.W. et al. 2012, BELKAID; BOULADOUX, et al. 2013, MOLLOY, G. et al. 2013).

Após determinados episódios de infecção aguda, é comum encontrarmos alterações estruturais do trato gastrointestinal. Essas complicações podem persistir por anos, mesmo após a eliminação do patógeno. Tais alterações são também encontradas em pacientes com doenças inflamatórias intestinais e caracterizam-se pela presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria, fibrose, calcificações, alterações na organização da estrutura dos linfonodos drenantes e aumento da permeabilidade intestinal (HAND, T.W., 2016).

Conforme descrito anteriormente, a barreira epitelial intestinal é formada por células epiteliais altamente adaptadas, que estão interconectados com junções interepiteliais e são cobertos com muco e peptídeos bactericidas. Isso permite que

apenas um número muito pequeno de microrganismos penetre no epitélio intestinal. No entanto, existem muitos agentes físicos e químicos que podem danificar essa barreira, permitindo que conteúdos luminais entrem na lâmina própria e desencadeiem uma inflamação (LINDEN, S.K., et al, 2008). Neste caso, DCs teciduais capturam e apresentam antígenos para os linfócitos T auxiliares que se diferenciam nos perfis Th1, Th2 e Th17 e produzem citocinas importantes no processo de inflamação, causando dano tecidual, caso não haja contrabalanceamento por uma resposta de células Treg (**Figura 2A**). No entanto, as investigações que utilizam proteínas das junções intercelulares manipuladas por meios genéticos mostraram que mecanismos imunes compensatórios agem para proteger a barreira intestinal, mesmo quando há permeabilidade intestinal aumentada, mostrando o papel dessas proteínas na regulação da homeostase imunológica, na lesão epitelial e no reparo da inflamação da mucosa (AHMAD, R. et al, 2017; SANSONETTI, J.P, 2004).

Ocasionalmente, a microbiota comensal e os antígenos luminais podem romper a barreira epitelial e invadir a lâmina própria. No entanto, componentes imunes inatos e adaptativos, localizados predominantemente na lâmina própria subepitelial, são normalmente capazes de prevenir reações inflamatórias excessivas (**Figura 2B**). Estes componentes incluem a presença de macrófagos com propriedades reguladoras, a produção de TGF- β e a indução de células Treg, além da produção de IgA pelos linfócitos B (AHMAD, R. et al, 2017).

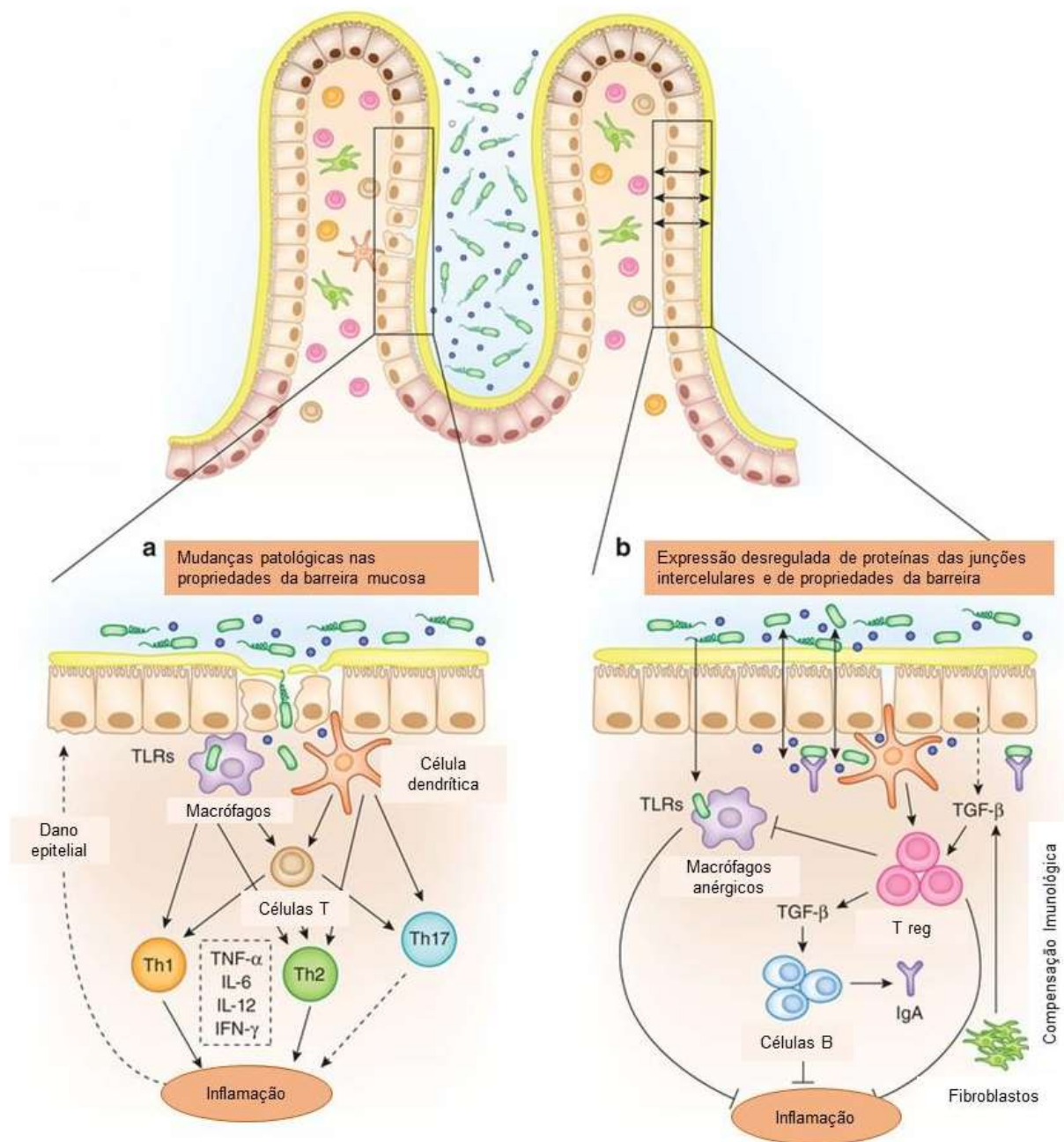


Figura 2: Relação entre as propriedades da barreira epitelial do intestino e o processo inflamatório. Modificada de Ahmad, R. et al, 2017. O epitélio intestinal constitui uma barreira física e bioquímica para separar efetivamente os antígenos luminiais e o sistema imunológico da mucosa. Uma quebra de homeostase induzida por patógenos na barreira da mucosa pode induzir a hiperativação do sistema imunológico e inflamação crônica (A). Componentes imunes inatos e adaptativos, como macrófagos reguladores, produção de TGF- β , indução de células Treg, e produção de IgA pelos linfócitos B, são normalmente capazes de prevenir reações inflamatórias excessivas (B).

Entender os mecanismos envolvidos nas respostas imunológicas do intestino tem sido um grande desafio, principalmente em contextos de exposições a patógenos intestinais. Para tal, se faz necessário o uso de modelos experimentais.

Recentemente, nosso grupo estabeleceu um modelo experimental murino de infecção intestinal por *Yersinia pseudotuberculosis*, capaz de quebrar a barreira imunológica intestinal. A infecção se dá pela via oral e a bactéria atravessa o intestino através das placas de Peyer, utilizando as células M como um mecanismo de transporte (**Figura 3**). A bactéria tem predileção pelo íleo, apêndice, linfonodos mesentéricos e fígado, causando linfadenite granulomatosa, ileíte e gastroenterite aguda febril com sintomas que mimetizam uma apendicite (TAUXE, 2004, ZIPPI, C. et al. 2006).

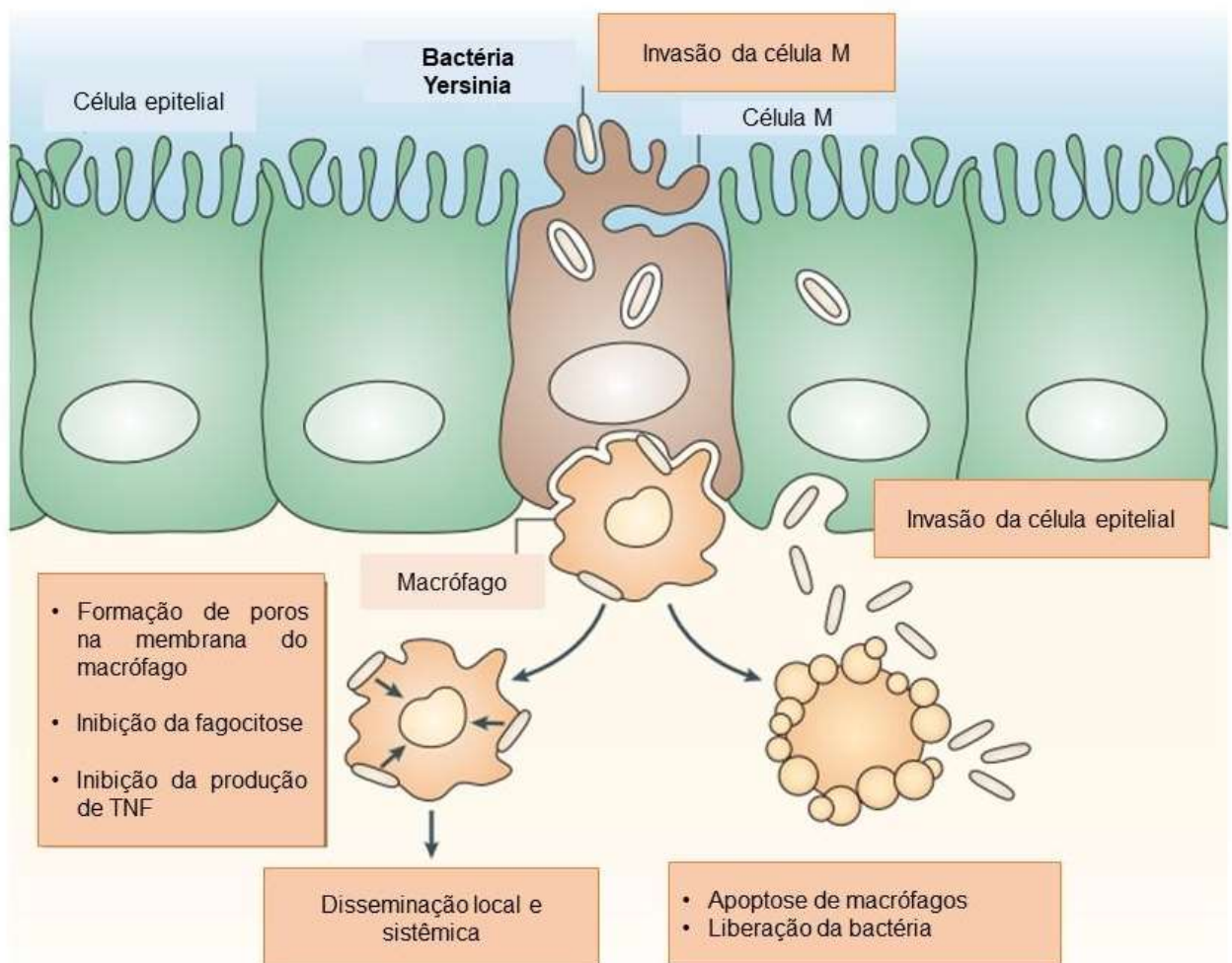


Figura 3: Etapas utilizadas por espécies de *Yersinia* enteropatogênicas para translocação do epitélio intestinal e desenvolvimento do processo infeccioso que leva à linfadenite mesentérica. Modificado de Sansonetti, J.P, 2004. *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica* atravessam a barreira epitelial através das células M do epitélio associado às placas de Peyer, principalmente na porção distal do intestino delgado. Estas bactérias resistem à fagocitose dos macrófagos através da injeção de fatores de virulência nestas células (YOPs, do inglês *Yersinia Outer Proteins*), usando um sistema secretor tipo III, levando à paralisação do citoesqueleto de actina. *Yersinia* também regula a inflamação, evitando assim os efeitos humorais e celulares da resposta imune inata. Outro tipo de mecanismo é a apoptose de macrófagos e a inibição da produção de TNF (do inglês tumor necrosis factor - fator de necrose tumoral). Como resultado, a bactéria resiste às defesas imunológicas do hospedeiro nos tecidos subepiteliais, permitindo-lhes invadir o epitélio e infectar os linfonodos mesentéricos.

Vários trabalhos sugerem a existência de uma associação entre a infecção por *Y. pseudotuberculosis* e o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, visto que DNA bacteriano e anticorpos específicos foram detectados em pacientes com formas graves da CD e existem ainda pacientes infectados por *Y. pseudotuberculosis* que desenvolvem CD anos após a eliminação da bactéria (SWARBRICK, K. et al. 1979, LAMPS, M. et al. 2003, ZIPPI, C. et al. 2006, IJICHI, K. et al. 2012).

Neste contexto, nosso grupo vem estudando, em modelo experimental, como esta bactéria pode interferir na homeostase imunológica da mucosa intestinal. Os resultados obtidos pelo nosso grupo mostram que camundongos infectados pela via oral com *Y. pseudotuberculosis* desenvolvem uma resposta inflamatória intensa no intestino, baço e linfonodos mesentéricos, caracterizada pela ativação de linfócitos específicos tanto para a bactéria, quanto para antígenos da microbiota comensal (Fonseca, Hand et al. 2015 e dados não publicados). Esta resposta inflamatória persiste por meses após a eliminação da bactéria, que ocorre entre 2-3 semanas após a infecção. Como consequência da inflamação crônica, ocorre um remodelamento do mesentério que inclui a presença de linfadenopatia mesentérica crônica, caracterizada pelo desenvolvimento de fibrose, necrose e lesões granulomatosas, além de aumento da permeabilidade dos vasos linfáticos e inflamação crônica no tecido adiposo mesentérico.

Tais alterações se desenvolvem após a eliminação completa da bactéria e persistem por mais de um ano, sugerindo que seriam lesões permanentes. Como consequência deste remodelamento, células dendríticas do subtipo CD103⁺CD11b⁺, que em situações normais migrariam do intestino para os linfonodos mesentéricos, não têm mais acesso a estes órgãos e ficam retidas no tecido adiposo mesentérico, por onde passam os vasos linfáticos que conectam o intestino aos linfonodos (FONSECA, HAND et al. 2015). Deste modo, a indução de respostas imunes intestinais canônicas (Treg, Th17 e IgA) encontra-se prejudicada, incluindo o desenvolvimento de imunidade contra vacinas orais. Isto ocorre porque após a resolução da infecção, há um aumento da permeabilidade dos vasos linfáticos intestinais, promovendo o extravasamento de produtos da microbiota intestinal, que se acumulam no tecido mesentérico adiposo, sustentando uma inflamação crônica.

A microbiota é essencial para esse fenômeno, que chamamos de “cicatriz imunológica”, visto que animais *germ-free* não apresentam tais defeitos e, em camundongos SPF (*specific pathogen-free*), essas alterações são acompanhadas de

disbiose intestinal e limitação na capacidade de produção de IgA em resposta à imunização pela via oral. Este fenótipo pode ser revertido após a eliminação da microbiota por antibióticos de amplo espectro e ocorre apenas mediante infecção com carga bacteriana mínima, ou seja, inóculos baixos não causam tais alterações e a bactéria é rapidamente eliminada pelo hospedeiro.

Considerando-se que os vasos linfáticos intestinais possuem uma função importante na captação, transporte e absorção de nutrientes, é possível que estes animais possam ser mais susceptíveis à desnutrição e a doenças entéricas frente a alterações de dieta e exposição a patógenos intestinais.

Acreditamos que tais efeitos não sejam específicos para esta bactéria e que determinadas infecções do trato gastrointestinal ou infecções recorrentes podem levar à quebra da homeostase intestinal, promovendo imunidade contra componentes próprios ou da microbiota e o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (KASER, ZEISSIG et al. 2010, HAND, T.W. et al. 2012, KORPE; PETRI, 2012, KORPE; STOTT et al. 2012, MONDAL, M. et al. 2012).

Neste contexto, acredita-se que infecções possam atuar como gatilhos no desenvolvimento dessas doenças, em particular na Enteropatia Ambiental (EE - do inglês, *Environmental Enteropathy*). A EE é um distúrbio intestinal predominante entre habitantes de países de baixa renda *per capita*, que geralmente vivem em ambientes com saneamento e higiene precários, e conseqüentemente estão expostos, de forma crônica, a diversos tipos de contaminantes, como patógenos fecais, por exemplo (PETRI, et al, 2014).

Esta tem sido a hipótese mais bem aceita para a etiologia da EE, crianças expostas a quadros recorrentes de infecção intestinal desenvolveriam inflamação crônica local que levaria à perda da integridade da barreira mucosa, associada com translocação de microbiota e sistematização da inflamação, que juntamente com a perda da função do epitélio intestinal, levaria à dificuldade de absorção de nutrientes. Este quadro de desnutrição, por sua vez, aumentaria a predisposição a novas infecções, fechando o ciclo (KORPE;PETRI, 2012, PRENDERGAST; KELLY, 2016).

Esta constante exposição a contaminantes pode levar a quadros de inflamações recorrentes, causando alterações estruturais no intestino delgado que podem resultar em mudanças funcionais. Estas mudanças incluem achatamento e atrofia das vilosidades intestinais, presença de infiltrado inflamatório, hiperplasia das

criptas intestinais, rompimento da barreira, com aumento da permeabilidade intestinal e translocação da microbiota comensal para a lâmina própria (KELLY et al. 2016).

Indivíduos acometidos por EE, possuem uma deficiência na absorção de diversos nutrientes e apresentam inflamação crônica, que podem contribuir para uma resposta imunológica intestinal deficiente, culminando em falhas nas respostas às vacinas orais, como a vacina *Sabin* contra a poliomielite. Além disso, estes indivíduos, principalmente crianças, possuem crescimento e desenvolvimento prejudicados (GILMARTIN et al, 2015). Por isso, vários grupos de pesquisa em todo o mundo têm estudado a fisiopatogenia desta doença, com ênfase nos estudos envolvendo: o efeito de infecções agudas subclínicas recorrentes, efeito da microbiota alterada (disbiose) e contribuição de dietas desbalanceadas para tais doenças.

Diante do exposto, acreditamos que condições que causem (1) alteração na função do sistema imune residente da mucosa intestinal, (2) alteração da composição da microbiota e (3) quebra da barreira intestinal podem estar associadas ao desenvolvimento de um amplo espectro de patologias que afetam o trato gastrointestinal, incluindo as doenças inflamatórias intestinais, EE e as alergias alimentares. Tais condições podem ser de origem infecciosa ou não, como no caso das alterações alimentares.

Sabemos que mudanças na dieta são capazes de alterar a microbiota comensal, e que essa alteração pode interferir no tônus imunológico tecidual. Essa mudança na resposta imunológica pode desencadear um processo inflamatório crônico no intestino que, pode tanto influenciar no metabolismo e interferir no crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, principalmente em um contexto de déficit proteico (desnutrição), quanto comprometer a capacidade do indivíduo de responder às vacinas e combater patógenos orais.

Dessa forma, a hipótese do nosso trabalho foi que o consumo de dietas desbalanceadas pode interferir na homeostase imunológica da mucosa intestinal e consequentemente levar a alterações permanentes da forma como esse sistema comporta-se mediante desafios ambientais como, por exemplo, infecções e exposição a antígenos alimentares. Entender os motivos que impedem o retorno da função intestinal após a eliminação dos agentes estressores é o grande desafio para a erradicação de patologias intestinais mediadas pelo sistema imunológico.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito de uma dieta desbalanceada hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos na homeostase imunológica intestinal e as consequências sistêmicas deste efeito.

2.1 Objetivos específicos

1. Determinar o efeito da alteração da dieta sobre o crescimento e desenvolvimento ósseo dos animais, assim como sobre a estrutura morfológica e o infiltrado leucocitário no intestino delgado;
2. Caracterizar o efeito diferencial da dieta desbalanceada hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos sobre as diferentes porções do intestino delgado;
3. Estudar o efeito do uso de dieta desbalanceada hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos sobre a resposta contra infecções intestinais subclínicas;
4. Estudar o efeito do uso de dieta desbalanceada hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos sobre a resposta contra antígenos alimentares;
5. Determinar a contribuição da microbiota alterada por infecção e da dieta para o déficit do desenvolvimento e inflamação desenvolvidos frente à infecção intestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6, OTII/Rag^{-/-} (CD45.2⁺), com 4 semanas de idade, obtidos do Biotério de Criação de Animais da Faculdade de Medicina – USP e do biotério de Criação de Animais Transgênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos, com ciclos alternados de 12h claro/escuro e foram fornecidos água e ração *ad libitum*. Todos os camundongos foram acondicionados no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Universidade de São Paulo, protocolo nº49/2016 (**ANEXO I**). A eutanásia dos animais foi realizada pela inoculação de dose excessiva de anestésico cetamina (375 mg/Kg) e xilazina (37,5 mg/Kg) por via intraperitoneal.

3.2 Dietas Especiais

Diferentes grupos de camundongos foram submetidos à dieta controle e à dieta desbalanceada imediatamente após o desmame. Esta dieta consistiu em uma composição hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos (**Tabela 1**), contudo para facilitar a descrição dos resultados, a partir deste momento, a dieta será apenas denominada como hipoproteica. As dietas foram obtidas junto à empresa RHOSTER.

	Dieta hipoproteica	Dieta Controle
Proteínas (% / peso)	5.8	17.7
Carboidratos (% / peso)	72.8	57.1
Lipídeos (% / peso)	1.9	5.9
Kcal/g	3.3	3.5

Tabela 1. Principais componentes das dietas controle e hipoproteica. Porcentagem dos principais constituintes das dietas controle e hipoproteica.

3.3 Pesagem semanal

Os animais foram identificados individualmente e, durante o tratamento com a dieta, os animais foram pesados semanalmente. Conforme indicado nas figuras, os animais submetidos à infecção foram pesados semanalmente, obedecendo sempre a

um mesmo dia e horário na semana. Os animais que foram submetidos à transplante fecal, foram pesados a cada três dias até completarem duas semanas após o transplante, e após este período, foram pesados semanalmente, também obedecendo a um mesmo dia e horário na semana.

3.4 Infecção Oral

Para a infecção, a bactéria *Y. pseudotuberculosis* (cepa IP32777) foi cultivada em meio líquido 2XYT (*Becton, Dickinson and Company*), a 25°C por 18h, sob agitação vigorosa. Após crescimento, a concentração de bactérias foi quantificada de acordo com a densidade óptica da cultura (obtida em 600nm), 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 200µL de solução salina contendo 1×10^7 ou 1×10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Y. pseudotuberculosis*, conforme indicado nas figuras.

3.5 Transplante de conteúdo fecal

Camundongos C57BL/6 com 6-8 semanas de idade foram infectados com a bactéria *Y. pseudotuberculosis*. Após o período de infecção ativa (4 semanas) os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésicos e os intestinos coletados em condições anaeróbicas. O conteúdo cecal foi retirado, homogeneizado em PBS (200mg/mL) e, após repouso de 10 min, foi congelado em tampão fosfato salino (PBS, do inglês phosphate buffered saline) anaeróbico, contendo 10% de glicerol (Sigma Life Sciences). Camundongos desmamados com 3 semanas de idade receberam 200µL desse conteúdo por gavagem, uma vez ao dia, por três dias consecutivos.

3.6 Avaliação do desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal

Para avaliar a distribuição corporal da gordura, os animais foram expostos ao In-Vivo Imaging System FX PRO no Centro de Facilidades para Pesquisa (CEFAP) - ICB / USP. Foram utilizados raio X com alta energia (filtro de 0.8mm) e raio X total (sem filtro – 0.0). A razão entre as duas imagens adquiridas foi calculada para avaliar a gordura corpórea nos animais. Para a mensuração do desenvolvimento ósseo foi

utilizado o software ImageJ para mensurar fêmur, cauda e altura corporal na imagem de Raio X.

3.7 Histologia

A coloração de hematoxilina e eosina (HE) foi utilizada para avaliar a estrutura histológica do intestino, previamente fixado em Formaldeído 10% (Synth). O intestino também foi corado com ácido periódico-Schiff- PAS (do inglês *Periodicacid-Schiff*), para avaliação da quantidade de muco. As peças foram enviadas à empresa Histocell para processamento em parafina, seguido de coloração, sendo preconizado uma espessura de 5 micrômetros para cada corte.

3.8 Obtenção de células do intestino

As células da Lâmina Própria intestinal foram obtidas de acordo com protocolo previamente padronizado (FONSECA, HAND et al. 2015). Para tal, o intestino foi coletado e lavado em PBS; as células intraepiteliais foram removidas por meio de agitação manual vigorosa em meio RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Sigma-Aldrich) contendo 2mM de EDTA (LGC Biotecnologia).

Para extração das células da lâmina própria intestinal, o tecido adiposo mesentérico foi removido e o conteúdo do interior do intestino foi lavado duas vezes em PBS (1X). As amostras foram transferidas para uma placa de 6 poços, preenchidas com RPMI contendo 3% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após este processo, as amostras foram transferidas para tubo cônico, onde passaram por três etapas de agitação vigorosa por 30 segundos em RPMI/SFB/EDTA. Essa etapa é importante para que haja remoção do muco.

Depois da etapa de agitação, os intestinos foram transferidos para um Erlenmeyer contendo RPMI incompleto, 5mM EDTA e 0,145mg/mL de DTT, e incubados por 25min, a 37°C e 220 rpm, etapa na qual as junções epiteliais começam a ser desfeitas.

Após a etapa de incubação, os intestinos foram filtrados e transferidos para tubo cônico contendo meio RPMI incompleto (não suplementado) e 2mM de EDTA. Esse conteúdo foi novamente agitado por 30 segundos e este procedimento foi repetido três vezes, sendo que entre cada repetição, os intestinos foram filtrados em peneira metálica.

Para a etapa de digestão, o tecido foi transferido para um béquer contendo solução de digestão grau IV (0,75mg/mL) (Sigma-Aldrich) e DNase I (0,5mg/mL) (Sigma-Aldrich) e incubou-se por 25min, a 37°C e 180rpm. Após o processo de digestão, as amostras foram filtradas em *Cell Strainer* (NEST Scientific) de 70µm e em seguida foram adicionados 10mL de meio RPMI contendo 3% de SFB. A suspensão celular foi centrifugada por 6 minutos, a 4°C, e a 1600 rpm. Após a centrifugação as amostras foram novamente filtradas em *Cell Strainer* de 70µm centrifugas e ressuspensas em meio RPMI contendo 5% de SFB, penicilina/estreptomicina (Hyclone), L-glutamina (Sigma-Aldrich), betamercaptoetanol (Sigma-Aldrich), aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich) e de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich). As amostras foram mantidas em gelo para realização da marcação fenotípica por citometria de fluxo.

3.9 Marcação de células para análise fenotípica e funcional por citometria de fluxo

As diferentes amostras de suspensão celular foram processadas para identificação de moléculas de superfície, intracelulares e intranucleares, de acordo com o protocolo descrito abaixo.

Para a marcação de moléculas extracelulares (superfície) as seguintes etapas foram seguidas: 100 µL (2×10^6 células) das células extraídas foram transferidas para uma placa de fundo "U" de 96 poços; o volume foi completado com solução salina balanceada de Hanks (HBSS, do inglês *Hank's Balanced Salt Solution*) (LGC Biotecnologia). As células foram marcadas com corante de viabilidade celular LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stains (LD, Thermo Fisher Scientific), (L/D 1:1000), e lavadas com tampão de FACS (PBS + 2% de SFB).

Para lavagem, as células foram centrifugadas durante 2 minutos, a 1600 rpm e ressuspensas em 30µL da mistura de anticorpos, juntamente com anticorpos anti-receptor para porção Fc de anticorpos (anti-CD16/32), para bloqueio. Em seguida, as células foram incubadas por 30min, a 4°C, protegidas da luz. As células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS e fixadas com paraformaldeído 2% (Electron Microscopy Sciences) (100 µL por poço) por 20 min, à temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram lavadas com tampão FACS, centrifugadas durante 2 minutos, a 1600 rpm e finalmente ressuspensas em 200 µL de tampão de FACS. As

amostras foram mantidas a 4°C, protegidas da luz até a leitura no equipamento BD LSRFortessa- BD Biosciences.

Para a marcação intranuclear de fatores de transcrição, as seguintes etapas foram seguidas: 100 µL (2×10^6 células) foram transferidas para uma placa de fundo “U” de 96 poços, centrifugadas durante 2 min, a 1600 rpm, ressuspensas em 30 µL de corante L/D (1:1000 em HBSS) e incubadas por 20min, a 4°C, protegidas da luz.

Após a primeira incubação, as células foram lavadas duas vezes com HBSS (200 µL/poço); ressuspensas em 30 µL da mistura de anticorpos de superfície; incubadas novamente por 30 min, a 4°C. Após a segunda incubação, foram lavadas duas vezes com tampão FACS (200 µL/poço), ressuspensas (100 µL/poço) em tampão de fixação (EbioScience) diluído (1 parte do tampão + 3 partes do diluente) e incubadas por 30min, a 4°C. Todo o procedimento após a incubação com os anticorpos foi realizado protegido da luz.

Depois dessas etapas, as células foram lavadas duas vezes com 200 µL/poço do tampão de permeabilização *Perm Wash* (EbioScience) diluído em água Milli-qQ (1x); ressuspensas com a mistura de anticorpos contra moléculas intra-nucleares diluídos em Perm wash (30 µL/poço); incubadas por 1h, a 4°C; lavadas duas vezes com *Perm Wash* (200 µL/poço); lavadas uma vez com tampão de FACS e por fim, ressuspensas em 100 µL de tampão de FACS.

Para avaliar a produção de citocinas, 2×10^6 células (100 µL) foram transferidas para uma placa de fundo “reto” de 96 poços e incubadas com 200 µL/poço de uma solução meio RMPI completo contendo estímulo: acetato miristato de forbol (PMA, do inglês, *Phorbol Myristate Acetate*) (50µg/mL) (Invitrogen), Ionomicina (500µ/mL) (Sigma-Aldrich) e Brefeldina A (BD Biosciences), por 4 horas em estufa com controle de CO₂.

Após a incubação o conteúdo foi transferido para uma placa de fundo “U” de 96 poços, centrifugado durante 3 min, a 1600 rpm, ressuspenso em HBSS (procedimento realizado duas vezes). Em seguida, a suspensão celular foi incubada com 30 µL/ poço da mistura de anticorpos de superfície, juntamente com anticorpo anti-receptor para porção Fc de anticorpos (anti-CD16/32) durante 30 minutos a 4°C, protegido da luz.

Após esta etapa, as células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS (200 µL/poço), ressuspensas em 50 µL de tampão *Citofix/Citoperm* (BD Biosciences) e incubadas por 20 min, a 4°C, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com o tampão *Perm Wash* (BD Biosciences) e foram adicionados

30 µL/poço da mistura de anticorpos intracelulares e as amostras foram incubadas por 2 h, a 4°C, protegidas da luz. Ao final da incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão *Perm Wash* (BD Biosciences), uma vez com tampão de FACS e finalmente, ressuspensas em 100 µL/poço de tampão de FACS.

Todos os clones dos anticorpos utilizados estão descritos na **Tabela 2**. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences), e todas as análises de citometria foram realizadas com o auxílio do software FlowJo® (BD-Biosciences).

3.10 Anticorpos utilizados

Anticorpo	Marca	Clone	Anticorpo	Marca	Clone
B220	Ebioscience	47-0452-82	IL-5	Biologend	TRFK5
CCR2	RD	FAB5538P-100	IL-13	Ebioscience	Ebio13a
CD4	Biologend	100547	IL-17	Ebioscience	Ebio17B7
CD8b	Biologend	YTS156.7.7	IL-22	Biologend	Poly5164
CD11b	Biologend	M1/70	LD	Invitrogen	N/A
CD11c	Biologend	117336	Ly6C	Biologend	HK1.4
CD44	Biologend	IM7	Ly6G	Biologend	127626
CD45	Biologend	30-F11	Ki67	Biologend	652426
CD64	Biologend	X54-5/7.1	MHC II	Biologend	M5/114.15.2
CD103	Ebioscience	46-1031-82	NK1.1	Biologend	108736
CD206	Biologend	C068C2	RORvt	Ebioscience	46-6981-82
FC Block (anti-CD16/32)	Bioxcell	2.4G2	SiglecF	BD Biosciences	562757
FOXP3	Ebioscience	12-5773-82	Tbet	Ebioscience	EBIO4B10
GATA3	BD	560077	TCRb	Ebioscience	47-5961-82
IL-4	Biologend	11B11	Thy1.2	Biologend	105331

Tabela 2. Anticorpos monoclonais utilizados.

3.11 Estratégias de análise dos resultados de citometria de fluxo

Para as estratégias de análise das populações celulares, com o intuito de selecionar as células de interesse, foram delimitadas (realização de gate) somente as células vivas (CD45⁺ LD⁻). Além disso, as células duplicadas foram excluídas. Depois, foram utilizados os parâmetros SSC-A (granulosidade) por FSC-A (tamanho) para localização dos leucócitos. No painel de anticorpos para marcação extracelular de

moléculas inatas foram plotados os gráficos para: Neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺MHCII⁻); Eosinófilos (CD11b⁺SiglecF⁺MHCII⁻); Macrófagos (CD64⁺Ly6C⁺CCR2⁻); Monócitos (CD11b⁺CD64⁺Ly6C⁺CCR2⁺MHC^{low}) e Células Dendríticas (MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺ ou MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺ ou MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺CD11b⁺), todas analisadas em populações negativas para Ly6C, Ly6G, CD64, SiglecF, CD19 e TCRβ.

Para a marcação de células T, ILCs, e fatores de transcrição foram feitas as gates para: células T CD4⁺ (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2⁺TCRβ⁺CD4⁺), células T CD8⁺(Singlets->Live> Linfócitos>Thy1.2⁺CD3⁺CD8⁺), ILC (Thy1.2⁺CD3⁻CD4⁻), Th1(T CD4⁺Tbet⁺CD44^{high}), Th2 (T CD4⁺GATA3⁺FoxP3⁻), Th17 (T CD4⁺ROR-γt⁺GATA3⁻), Treg (T CD4⁺FoxP3⁺),Treg GATA3⁺(TCD4⁺GATA3⁺FoxP3⁺), ILC1 (Thy1.2⁺CD3⁻Tbet⁺GATA3⁻NK1.1^{+/-}), ILC2 (Thy1.2⁺TCRβ⁺GATA3⁺RORγt) e ILC3 (Thy1.2⁺TCRβ⁺Rorgt⁺GATA3⁻).

Quanto a marcação intracelular de citocinas secretadas por células linfóides inatas (TCRβ⁻) e adaptativas (TCRβ⁺) foram feitas as gates para IFN-γ (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2⁺TCRβ^{-/+}CD4⁺D44⁺IFNγ⁺IL-17⁻), IL-17 (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2⁺TCRβ^{-/+}CD4⁻CD44⁺IL-17⁺IL5⁻), IL-22 (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2⁺TCRβ^{-/+}CD4⁻CD44⁺IL-22⁺IL-5⁻),IL-5 (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2⁺TCRβ^{-/+}CD4⁻CD44⁺IL-22⁻IL-5⁺) e IL-4 (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2⁺TCRβ^{-/+}CD4⁻CD44⁺IL-4⁺IL-22⁻).

3.12 Análise de tSNE

Realizamos a análise multifatorial dos marcadores utilizados na citometria de fluxo para caracterização das células, além da análise de citometria usual. Para tal, utilizamos o algoritmo “t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE) para redução de dimensionalidade. Este algoritmo é capaz de agrupar todos os parâmetros adquiridos na análise por ordem de interação, os aproximando de acordo com a similaridade dos marcadores.

Para as marcações extracelulares, realizamos a amostragem dos eventos (*DownSample*) dos leucócitos vivos (Live and Dead⁻CD45⁺). As populações foram concatenadas, agrupando os marcadores similares e em seguida aplicamos o algoritmo, utilizando um total de 10000-100000 eventos por amostra, que foi o número padronizado para melhor visualização dos resultados (**Figura 4**). O mesmo processo foi realizado para as marcações intracelulares (fatores de transcrição e citocinas).

Após as interações, os grupos experimentais foram separados e foi realizada a delimitação das populações celulares em cada grupo. Utilizamos as mesmas estratégias de gate utilizadas na análise convencional.

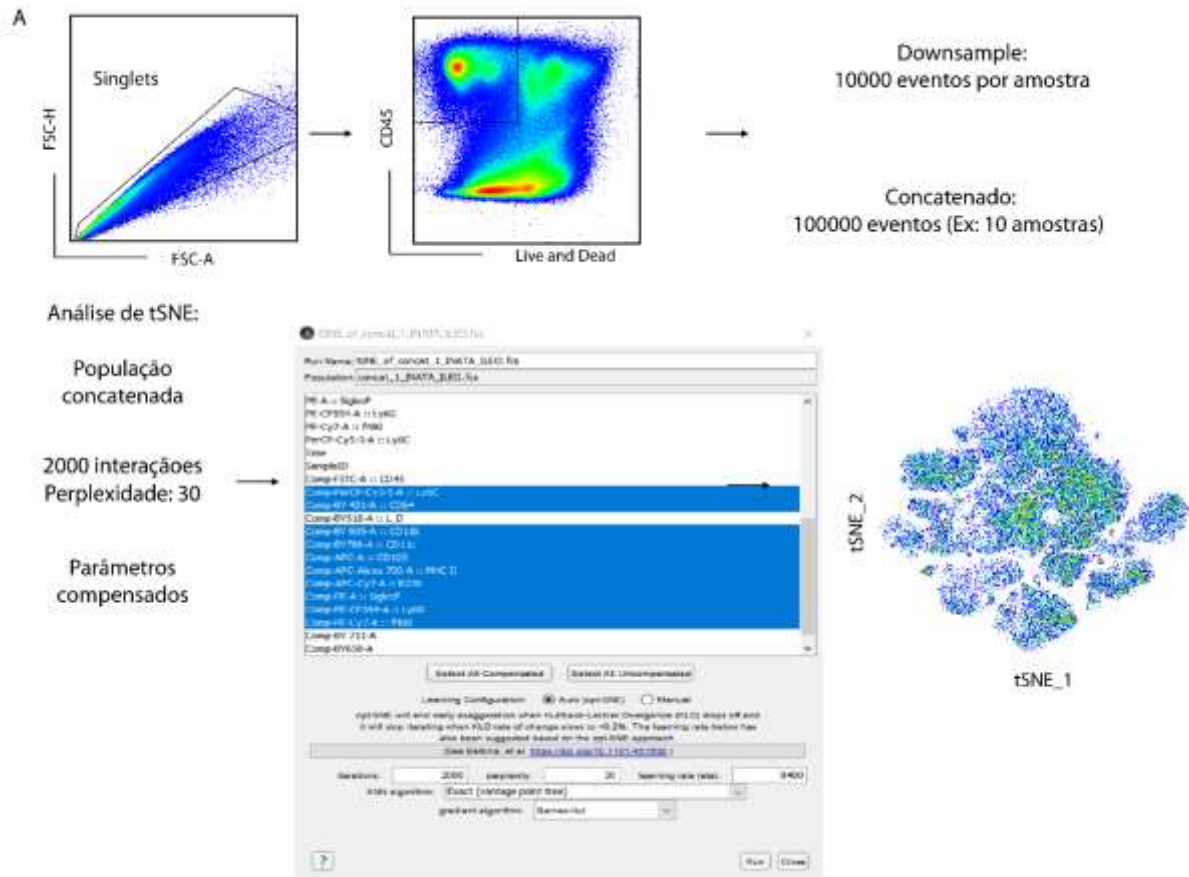


Figura 4: Análise “t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE). Foi realizada a análise convencional de citometria de fluxo, com a finalidade de obter os leucócitos viáveis. (Live and Dead-CD45⁺). Foi realizado o “DownSample” dessa população celular e em seguida a mesma foi concatenada (agrupadas por similaridade de marcadores). Utilizamos 10000-100000 eventos por amostra, ou seja, em um grupo experimental de 10 amostras, teremos um total de 100000-1000000 eventos na população concatenada. Para o processo de concatenação, aplicamos os parâmetros pré estabelecidos de 2000 interações, perplexidade=30 e selecionamos apenas os marcadores de interesse (para marcações extracelulares e intracelulares) e parâmetros compensados. Por fim, aplicamos o algoritmo tSNE.

3.13 Translocação bacteriana

Para avaliar a translocação de bactérias viáveis do trato gastrointestinal para locais extra intestinais (mLNa, fígado e baço), foi realizada a eutanásia dos animais e retirados os órgãos em condições estéreis. Os órgãos foram macerados em PBS estéril e filtrados em *Cell Strainer* 70 µm. Alíquotas de 10 e 100 µL foram transferidas para os meios de cultura MacConkey e BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*). As placas

foram incubadas por 48h, a 37°C e o crescimento bacteriano foi acompanhado por meio da contagem de UFCs.

3.14 Hemograma

Para a realização do hemograma foi utilizado o analisador hematológico automático BC-2800Vet da Mindray, que se encontra no serviço de citometria do Departamento de Imunologia. Este equipamento é utilizado para fazer hemograma de animais, utilizando amostras de sangue total com anticoagulante (EDTA). A amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca, logo após a eutanásia dos animais e foi adicionado 10% de anticoagulante EDTA (LGC Biotecnologia).

O aparelho fornece os seguintes parâmetros: RBC = GV – glóbulos vermelhos ou eritrócitos; HCT = Ht – hematócrito; HGB = Hb – hemoglobina; MCV = VCM – volume corpuscular médio (tamanho das células); MCH = HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM = MCHC – concentração de hemoglobina corpuscular média (concentração de hemoglobina das hemácias); RDW-CV = ADVGVC – coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; RDW-SV = ADVGSD – desvio padrão da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; PLT – Plaquetas MPV = VPM – volume plaquetar médio; WBC = GB – Leucócitos (células brancas); LYMPH% = %LINF – porcentagem de linfócitos; Mid# = n° med – célula de tamanho média (eosinófilo, basófilo, monócito); Gran# = n° gran. – granulócitos (neutrófilos); % méd = mid% - porcentagem de células de tamanho médio; Gran% = %gran – porcentagem de granulócitos; PDW = ADP – amplitude da distribuição de plaquetas; PCT = Plaquetócrito.

3.15 Transferência celular e marcação com Cell Tracer Violet

Baço e linfonodos de camundongos Rag^{-/-} com TCR transgênico OT-II (CD45.2) foram coletados e macerados em *Cell Strainer* 70 µm em meio RPMI incompleto (com antibiótico). O conteúdo foi centrifugado durante 8 min, a 4°C e 1600 rpm e os glóbulos vermelhos foram lisados com 300 µL de tampão de lise ACK. Após a lise, o conteúdo foi centrifugado 8 min, a 4°C e 1600 rpm e as células foram contadas em Câmara Neubauer. A suspensão celular foi transferida para um tubo cônico contendo HBSS estéril pré-aquecido (37°C), de modo que a concentração celular foi de 10⁸ células/mL. Em outro tubo, foi colocado o mesmo volume de HBSS usado na suspensão celular e adicionado o corante Cell Tracer Violet (Invitrogen), 1 µl para cada 1x10⁸ células/mL.

A solução com o corante Cell Tracer Violet foi adicionada à suspensão celular e incubada durante 20 min, a 37 °C, sendo agitada manualmente a cada 5 minutos e logo após foram adicionados 5 volumes de HBSS estéril contendo 10% de SFB. A solução foi incubada no gelo por mais 10 min, sendo homogeneizado manualmente a cada 3 min. A solução foi centrifugada durante 8 min, a 4°C e a 1500 rpm. Em seguida as células foram recontadas.

Após esta etapa, as células foram marcadas com L/D e com as moléculas de superfície TCR β , CD4 e CD44. Utilizamos o citômetro de fluxo para quantificar os linfócitos naives CD4⁺. Ajustamos a solução para a concentração de 1X10⁶ células TCD4⁺ naives/100 μ L por animal e administramos em camundongos CD45.1⁺, pela via intravenosa.

3.16 Ensaio de rastreamento da resposta específica para antígenos orais

A transferência celular descrita no item 3.15, foi realizada em camundongos CD45.1⁺ de 10 semanas de idade alimentados com as dietas controle ou hipoproteica por 6 semanas. Após um dia da transferência, os camundongos receberam ovalbumina (OVA grau IV; Sigma-Aldrich) (1,5%) na água de beber, todos os dias, durante uma semana. Em seguida, os camundongos foram eutanasiados com dose excessiva de anestésicos e o intestino delgado e linfonodo mesentérico foram removidos, processados e marcados com anticorpos de superfície e intracelular para análise do rastreamento e diferenciação das células transgênicas OTII transferidas.

3.17 Análise estatística

Os dados foram expressos a partir da média \pm desvio padrão e os resultados comparados usando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey em experimentos com mais de dois grupos. No caso de experimentos com apenas dois grupos experimentais, foi utilizado a análise com teste T (não-pareado). O software utilizado foi o Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores de P <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da dieta hipoproteica no crescimento e desenvolvimento dos animais

Para avaliar o impacto de uma dieta desbalanceada no crescimento e no desenvolvimento dos animais, camundongos C57BL6, com quatro semanas de idade foram submetidos à dieta hipoproteica proposta por Brown e colaboradores (2015), uma dieta baseada em carboidrato (72,8%) e pobre em proteínas (5,8%) e lipídios (1,9%), e mantidos na mesma dieta por seis semanas (**Figuras 5A e B**).

Mensuramos o peso desses animais semanalmente e encontramos uma diminuição no peso absoluto e na porcentagem de ganho de peso dos animais tratados com a dieta hipoproteica nas semanas iniciais ao tratamento em comparação ao grupo controle (**Figuras 5C-E**). No entanto, não houve prejuízos significativos no peso corpóreo final e no desenvolvimento corpóreo dos mesmos ao longo do tempo, comparados com os animais alimentados com a dieta controle (**Figuras 5F e G**). Constatamos apenas uma redução discreta do tamanho dos animais que receberam dieta hipoproteica ao final do experimento.

Diante da discreta diminuição do ganho de peso e tamanho dos animais submetidos à dieta desbalanceada, analisamos os diferentes compartimentos de tecido adiposo branco por meio de imageamento *in vivo* (Imaging System FXPRO) (**Figuras 6A e B**). Comparamos a distribuição da gordura corpórea dos animais submetidos a dieta hipoproteica em relação aos animais em dieta controle. A quantificação da porcentagem de gordura periférica nesses grupos experimentais não mostrou alterações significativas nos animais que ingeriram baixa quantidade de proteína, em comparação aos animais controle (**Figuras 6A e B**). Estes resultados sugerem que a diferença encontrada no tamanho dos animais ao final do experimento possa estar associada com uma alteração discreta na massa magra dos animais.

Posteriormente avaliamos a ingesta alimentar dos dois grupos experimentais com o intuito de avaliar se este poderia ser o motivo da aparente diminuição no ganho de peso. Entretanto, não encontramos diferenças significativas na ingesta alimentar avaliada ao longo de 5 dias na última semana de tratamento dos animais (**Figura 6C**).

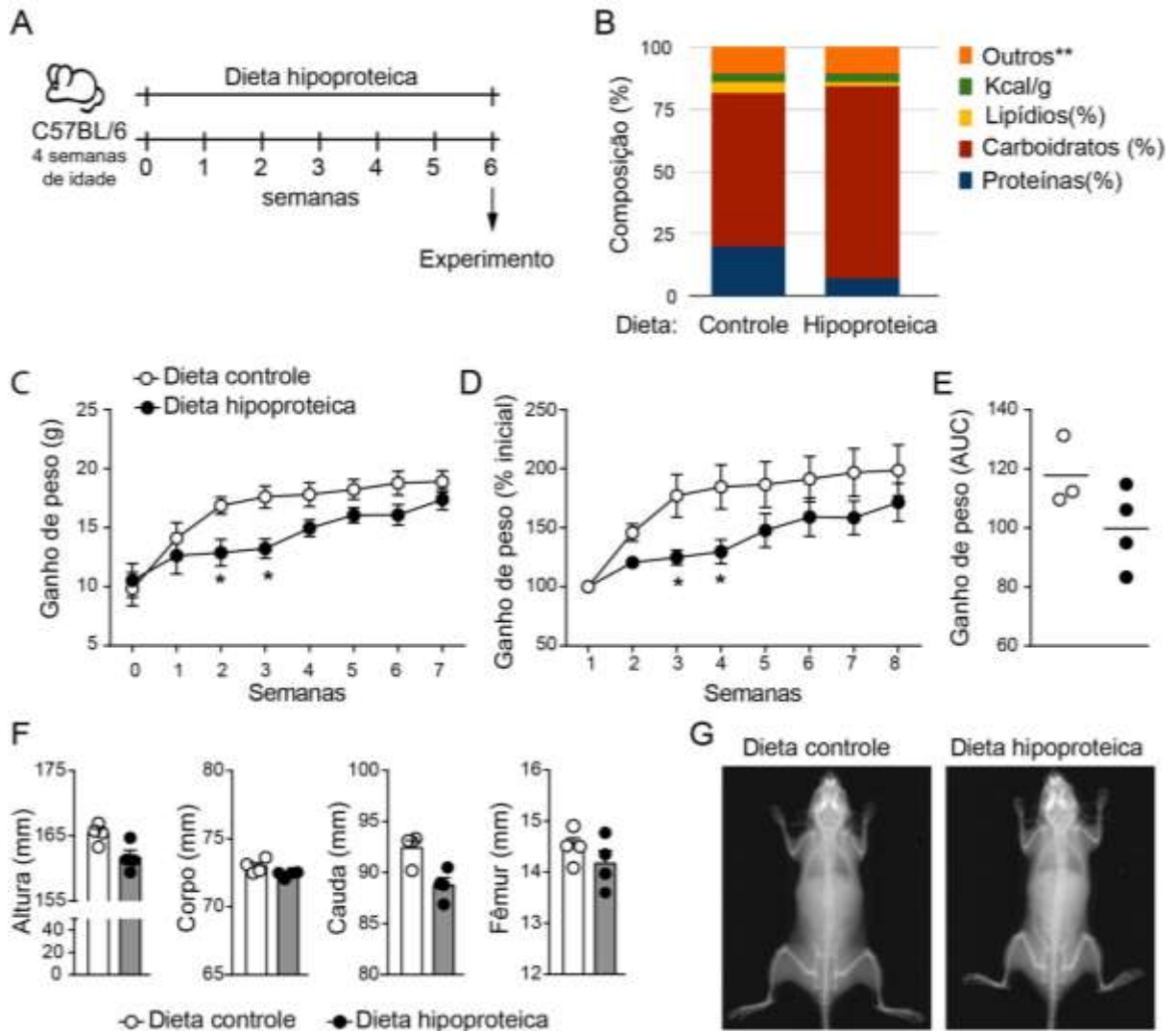


Figura 5: Avaliação do crescimento e desenvolvimento corporal de animais submetidos à dieta de hipoproteica. Camundongos C57BL/6, com quatro semanas de idade foram tratados com a dieta de hipoproteica por seis semanas (A). Gráfico da composição das dietas controle e hipoproteica, contendo porcentagem de lipídios, proteínas, carboidratos e a quantidade de calorias por grama de ração (B). Ganho de peso em gramas (C), porcentagem de ganho de peso (D) e área sob a curva (do inglês, *area under curve* -AUC) do ganho de peso dos animais ao decorrer de seis semanas de tratamento com a dieta hipoproteica (E). Altura, tamanho do corpo (sem a cauda), tamanho da cauda e do fêmur, em milímetros, de animais submetidos à dieta controle e à dieta hipoproteica (F). Imagem radiográfica representativa dos animais tratados com as diferentes dietas (G). Resultado representativo de um experimento, repetido uma vez, n=5 animais por grupo experimental. * P<0.05.

Paralelamente, ainda avaliamos as estruturas morfológicas dos diferentes compartimentos de tecido adiposo branco. Não encontramos alterações significativas no tamanho dos adipócitos nos cortes histológicos do tecido adiposo subcutâneo (scAT) entre os diferentes grupos experimentais. Entretanto, o tamanho dos adipócitos dos cortes histológicos do tecido adiposo perigonadal (prgAT) estavam visivelmente menores no tecido adiposo do grupo que recebeu dieta hipoproteica em comparação ao grupo controle. Entretanto, o resultado obtido no tecido adiposo mesentérico (mesAT) foi o oposto (Figuras 6D-F, fotos à esquerda).

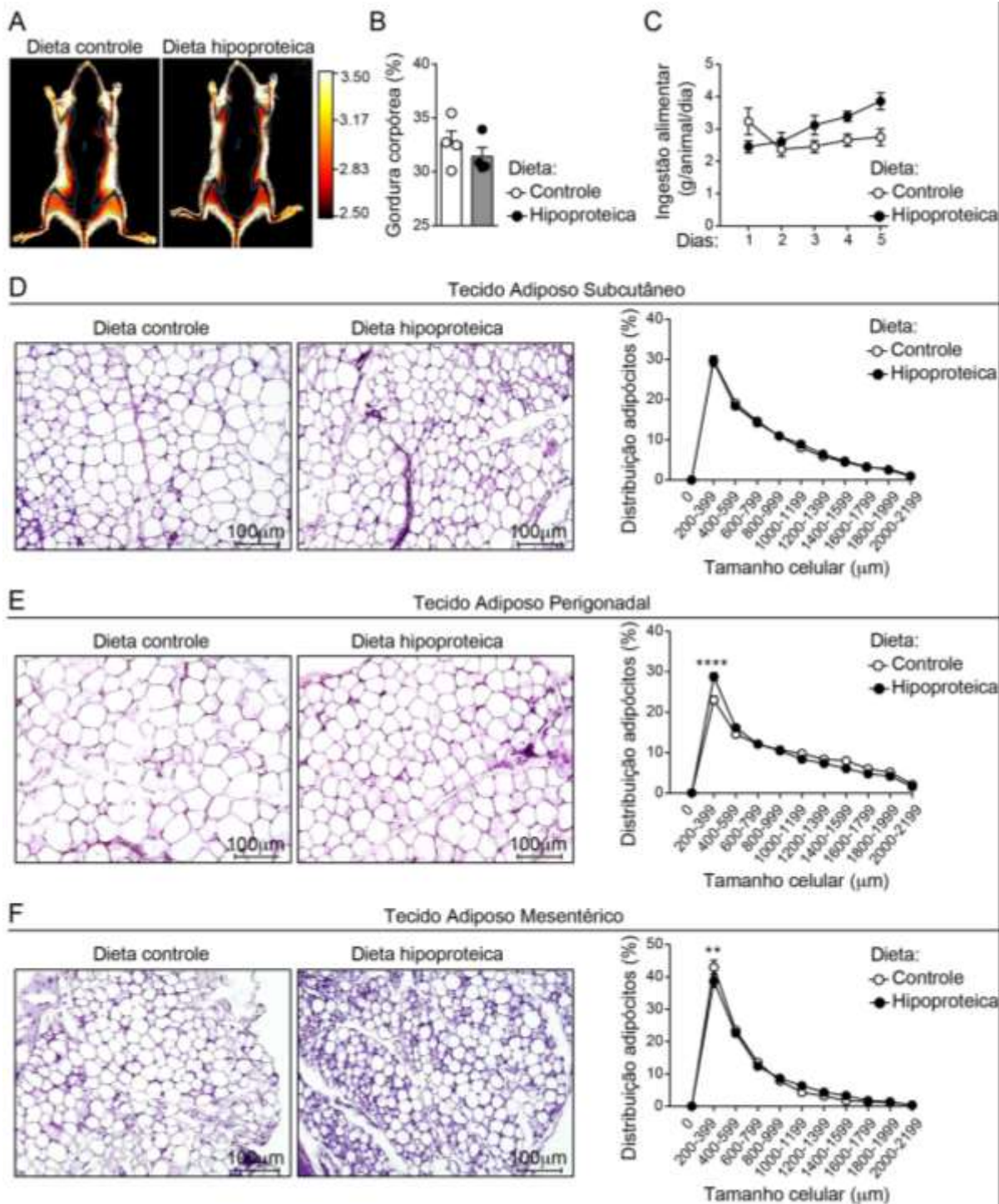


Figura 6: Remodelamento dos compartimentos de tecido adiposo após alteração na dieta. Imagens representativas da avaliação da distribuição de gordura corpórea por meio de In-Vivo Imaging System FX PRO após 6 semanas de alimentação com as dietas indicadas (**A**). Quantificação da porcentagem de gordura periférica em ambos os grupos experimentais (**B**). Análise da ingestão de ração por 5 dias em ambos os grupos experimentais, na sexta semana de tratamento (**C**). Fotomicrografias representativas de cortes histológicos dos compartimentos de tecido adiposo branco, conforme indicado na figura (**D**, **E**, **F**). Tecidos corados com Hematoxilina& Eosina (imagens a esquerda) e distribuição dos adipócitos por tamanho celular em μm^2 nos tecidos indicados (gráficos a direita). Resultados representativos de um experimento reproduzido 1 vez, $n=5$ animais por grupo experimental. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; **** $P<0.0001$.

A quantificação da distribuição dos adipócitos por tamanho celular em μm^2 confirmou estes resultados: um aumento da porcentagem de adipócitos com uma área menor no tecido adiposo perigonadal e uma diminuição da porcentagem de adipócitos com área menor no tecido adiposo mesentérico dos animais alimentados com dieta desbalanceada com relação aos animais controle (**Figuras 6D-F**, gráficos à direita). Estes resultados podem estar associados ao perfil do infiltrado inflamatório que se estabelece nos diferentes depósitos de tecido adiposo após o tratamento com a dieta hipoproteica (Siqueira et al, dados não publicados).

Diante destes resultados, sugerimos que, embora o tratamento com a dieta esteja associado com uma discreta alteração no desenvolvimento corpóreo do animal, não foi capaz de causar um quadro de déficit de desenvolvimento nos animais tratados.

4.2 Influência da dieta hipoproteica nas células presentes na circulação sanguínea

Em virtude das discretas mudanças causadas pela dieta hipoproteica no desenvolvimento corporal, realizamos o hemograma dos animais submetidos a dieta desbalanceada (**Figura 7A**) com o intuito de avaliar se a dieta pode alterar parâmetros sanguíneos que podem servir como indicadores de desnutrição.

Entre os parâmetros hematológicos descritos na **Figura 7**, encontramos uma redução significativa na média do volume das hemácias-MCV (**Figura 7F**) e um aumento significativo da concentração de hemoglobina-MCHC (**Figura 7H**) nos animais em condições de baixa ingestão de proteínas, quando comparados aos animais controle. Os demais parâmetros analisados, incluindo a contagem de leucitos no sangue não foram diferentes entre os grupos experimentais.

Visto que não foram encontradas alterações suficientes para indicar uma condição de desnutrição, destacamos que a dieta é considerada como desbalanceada. No entanto, esse desequilíbrio não foi capaz de causar desnutrição nesses animais.

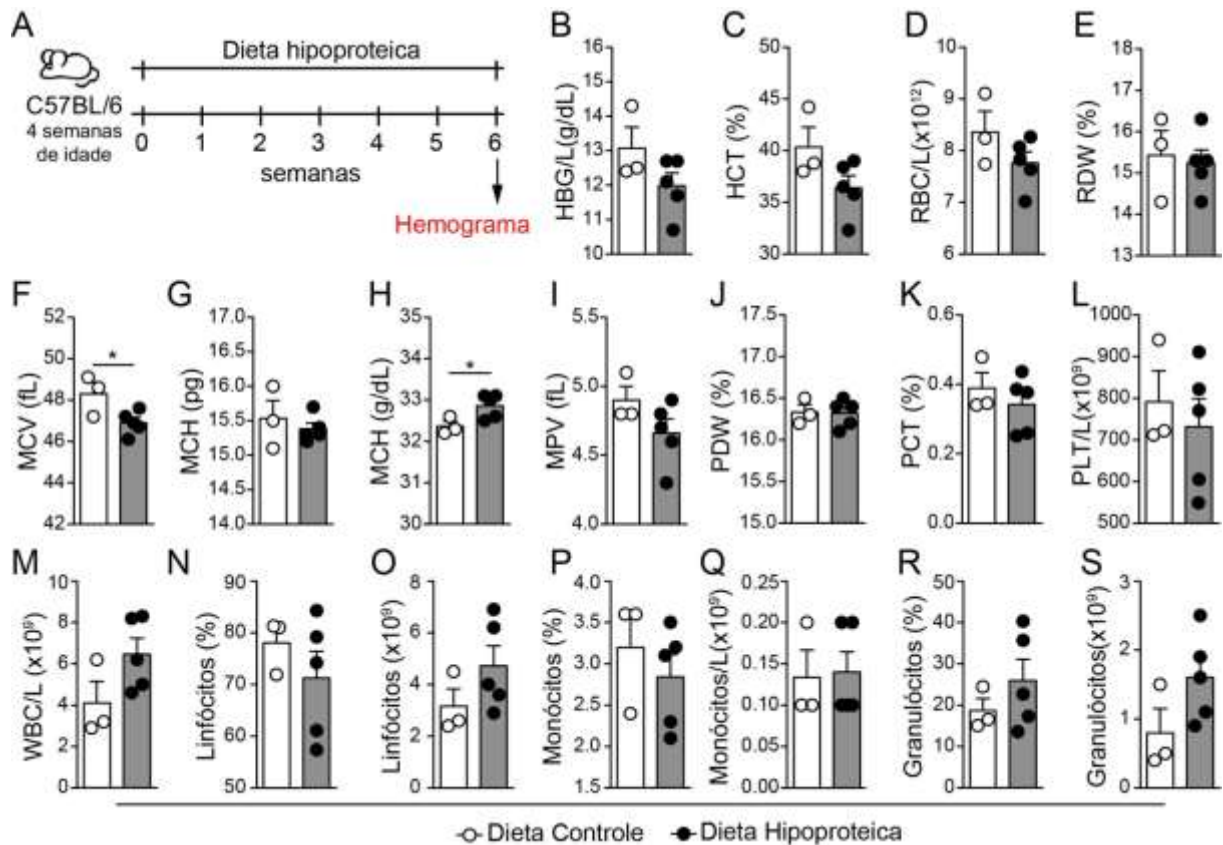


Figura 7: Alterações nos parâmetros hematológicos pós-ingestão de dieta com baixa quantidade de proteínas. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta pobre em proteínas e baseada em carboidratos por 6 semanas. Ao final deste período, foram coletadas amostras de sangue desses animais e realizado hemograma utilizando hematocitômetro (A). Dosagem de hemoglobina-HGB (B) em gramas por decilitro, porcentagem do hematócrito-HCT (C), número de glóbulos vermelhos por litro-RBC (D), porcentagem de variação da distribuição dos glóbulos vermelhos-RDW (E), média do volume das hemácias, em onça líquida-MCV (F), hemoglobina corpuscular média, em pictogramas-MCH (G), concentração de hemoglobina, em gramas por decilitro-MCH (H), volume plaquetário médio, em onça líquida-MPV (I), distribuição das plaquetas-PDW (J), porcentagem de plaquetas-PCT (K) e quantidade de plaquetas por litro-PLT (L), Número total de leucócitos-WBC (M), porcentagem de linfócitos (N), número de linfócitos por litro (O), porcentagem de monócitos (P), número de monócitos por litro (Q), granulócitos (R); número de granulócitos por litro (S). Resultados representativos de um experimento, repetido 1 vez, n= 3-5 animais por grupo experimental. *P<0,05.

4.3 Efeito da dieta hipoproteica na imunidade da mucosa intestinal

Dadas as alterações descritas anteriormente e ao conhecimento amplamente difundido na literatura de que mudanças na dieta são capazes de alterar a imunidade intestinal, analisamos o intestino delgado (**Figura 8A**) de animais submetidos à dieta hipoproteica. Inicialmente, após a coleta do órgão, verificamos que a dieta causou uma redução significativa do tamanho total do intestino delgado (**Figura 8B**). Este encurtamento sugere uma alteração do infiltrado inflamatório local. Com o intuito de caracterizar este infiltrado inflamatório, foi realizada a extração e análise das células presentes na lâmina própria por citometria de fluxo.

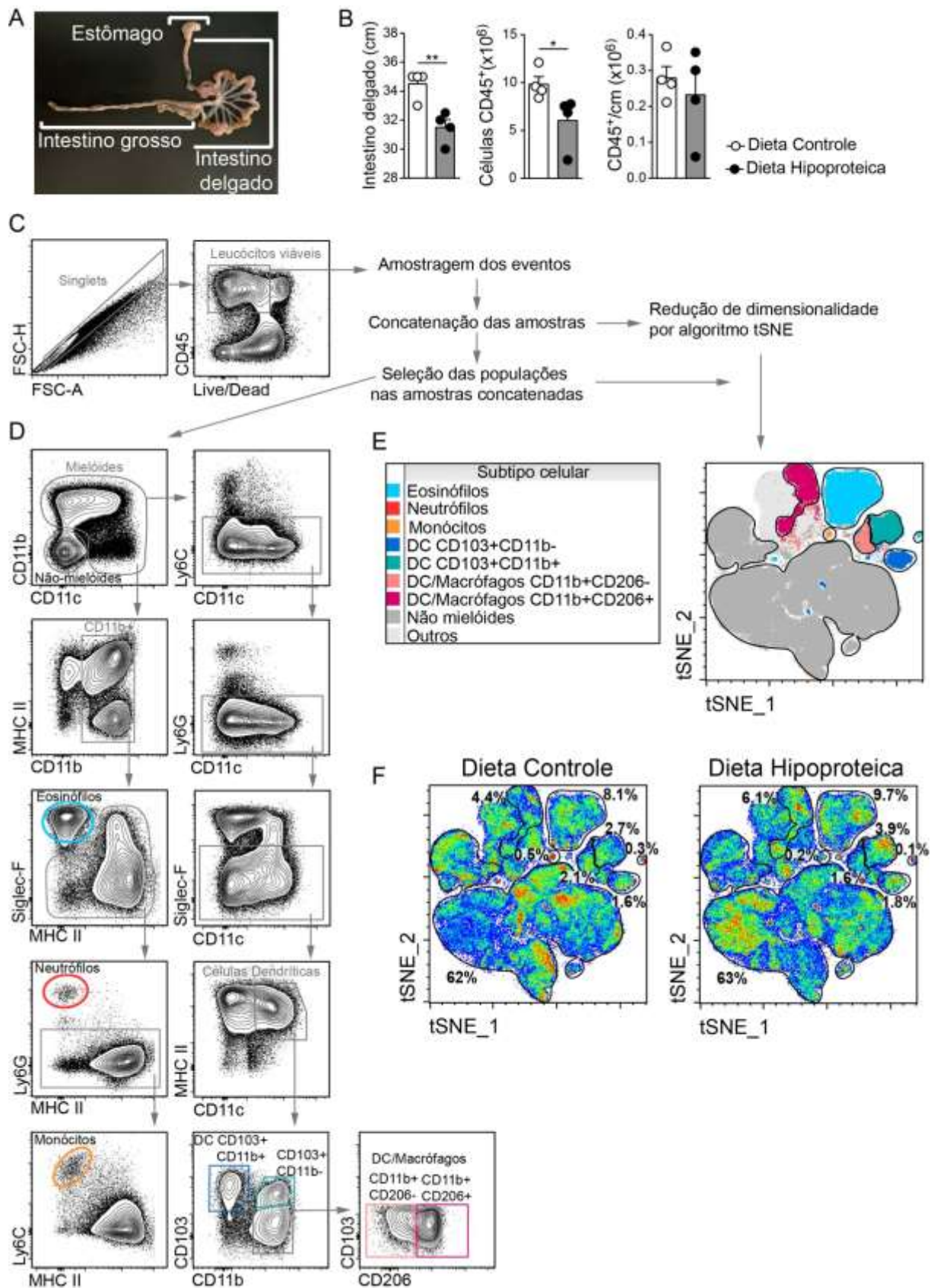


Figura 8: Análise do infiltrado de células mielóides da lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta deficiente em proteínas/lipídeos e baseada em carboidrato por 6 semanas. Ao final deste período, o intestino delgado dos animais foi coletado e processado para análise por citometria de fluxo (A). O comprimento do intestino foi medido (B) e o número de leucócitos CD45⁺ foi determinado no órgão

inteiro ou proporcionalmente ao comprimento (C). Estratégia de análise utilizada para a identificação de leucócitos e das diferentes populações celulares por citometria de fluxo (C,D). Análise estocástica tSNE das células mieloides no infiltrado inflamatório intestinal (E). O gráfico do tSNE indica as diferentes populações celulares em diferentes cores nas amostras concatenadas de acordo com a estratégia de análise em (D) e os gráficos em (F,G) mostram a frequência de cada uma destas populações delimitadas em amostras concatenadas de cada grupo experimental. Resultados representativos de um experimento, repetido 3 vezes. n=4 animais por grupo experimental.

Encontramos uma redução significativa no número absoluto de leucócitos (CD45⁺) no intestino (**Figura 8B**). Esta redução estava associada à diminuição do tamanho do intestino, visto que a densidade de leucócitos por centímetro de intestino foi similar entre os grupos experimentais (**Figura 8B**).

A análise multifatorial das células mieloides inatas presentes na lâmina própria intestinal foi realizada através do algoritmo “*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*” (tSNE). Este tipo de análise os aproxima os parâmetros avaliados por ordem de interação (similaridades de marcadores) para diminuir a dimensionalidade dos dados obtidos e permite a avaliação de múltiplas populações celulares simultaneamente (**Figuras 8C-D**). Tal análise demonstrou alterações nas populações mieloides entre os grupos, onde podemos observar um discreto aumento de eosinófilos e de algumas populações de DCs e macrófagos em paralelo a uma redução dos neutrófilos e monócitos nos animais tratados com dieta hipoproteica em comparação ao grupo controle (**Figuras 8E-F**).

De fato, quando quantificamos individualmente estas populações celulares, verificamos que, quando comparado ao grupo controle, o grupo tratado com a dieta hipoproteica exibiu um aumento significativo na frequência de eosinófilos, de DCs CD103⁺CD11b⁺ e de uma população de células mieloides CD11c⁺CD11b⁺CD103⁻CD206⁺, que pode compreender macrófagos M2 ou células dendríticas (**Figuras 9A, D e F**). Em paralelo, o tratamento com a dieta levou a uma redução significativa na frequência e no número absoluto de neutrófilos, monócitos e de uma população de células mieloides CD11c⁺CD11b⁺CD103⁻CD206⁻, que pode compreender macrófagos M1 ou células dendríticas com caráter mais inflamatório (**Figuras 9B, C e G**).

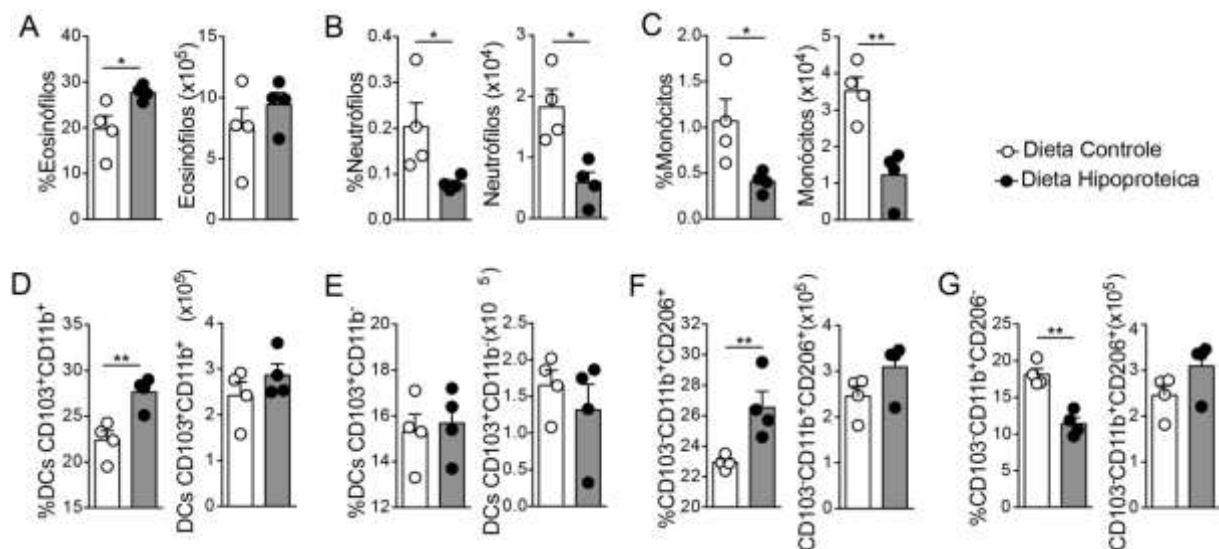


Figura 9: Análise do infiltrado de células mieloides da lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta deficiente em proteínas/lipídeos e baseada em carboidratos por 6 semanas. Ao final deste período, o intestino delgado dos animais foi coletado e processado para análise por citometria de fluxo. As diferentes populações de células mieloides foram identificadas de acordo com a estratégia de análise descrita na **Figura 8C-D**. Resultados expressos como média +/- erro padrão da média do número absoluto ou da frequência de cada tipo celular analisado dentro da população de células mieloides CD11b⁺CD11c⁺ (**A-C**) ou dentro da população de DCs CD11c⁺MHCII⁺ (**D-G**). Resultados representativos de um experimento, repetido 3 vezes. n=4 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P< 0,01.

As diferentes populações de células dendríticas intestinais são responsáveis pela ativação e polarização de padrões específicos de células linfoides encontradas na mucosa intestinal. Por isso, também estudamos o infiltrado de células linfoides inatas e adaptativas na lâmina própria intestinal. Analisamos a quantidade e a proporção relativa de linfócitos T CD4⁺ de padrão Th1, Th2, Th17 e de células linfoides inatas do tipo ILC1, ILC2 e ILC3, com base na expressão dos fatores de transcrição Tbet, GATA3, ROR γ t e Foxp3, que caracterizam tais subtipos celulares (**Figura 10A**). Os dados obtidos a partir da análise multidimensional (tSNE) mostraram diferenças discretas no infiltrado de linfócitos T e ILCs entre os grupos experimentais (**Figuras 10B-C**). Quando comparados ao grupo controle, animais que receberam a dieta hipoproteica exibiram um aumento das células Treg, incluindo aumento das subpopulações de Treg que expressam GATA3 e ROR γ t, assim como de células ILCs dos grupos 1 e 2. Por outro lado, as ILC3 estavam reduzidas no grupo tratado com a dieta em comparação ao controle (**Figuras 10B-C**).

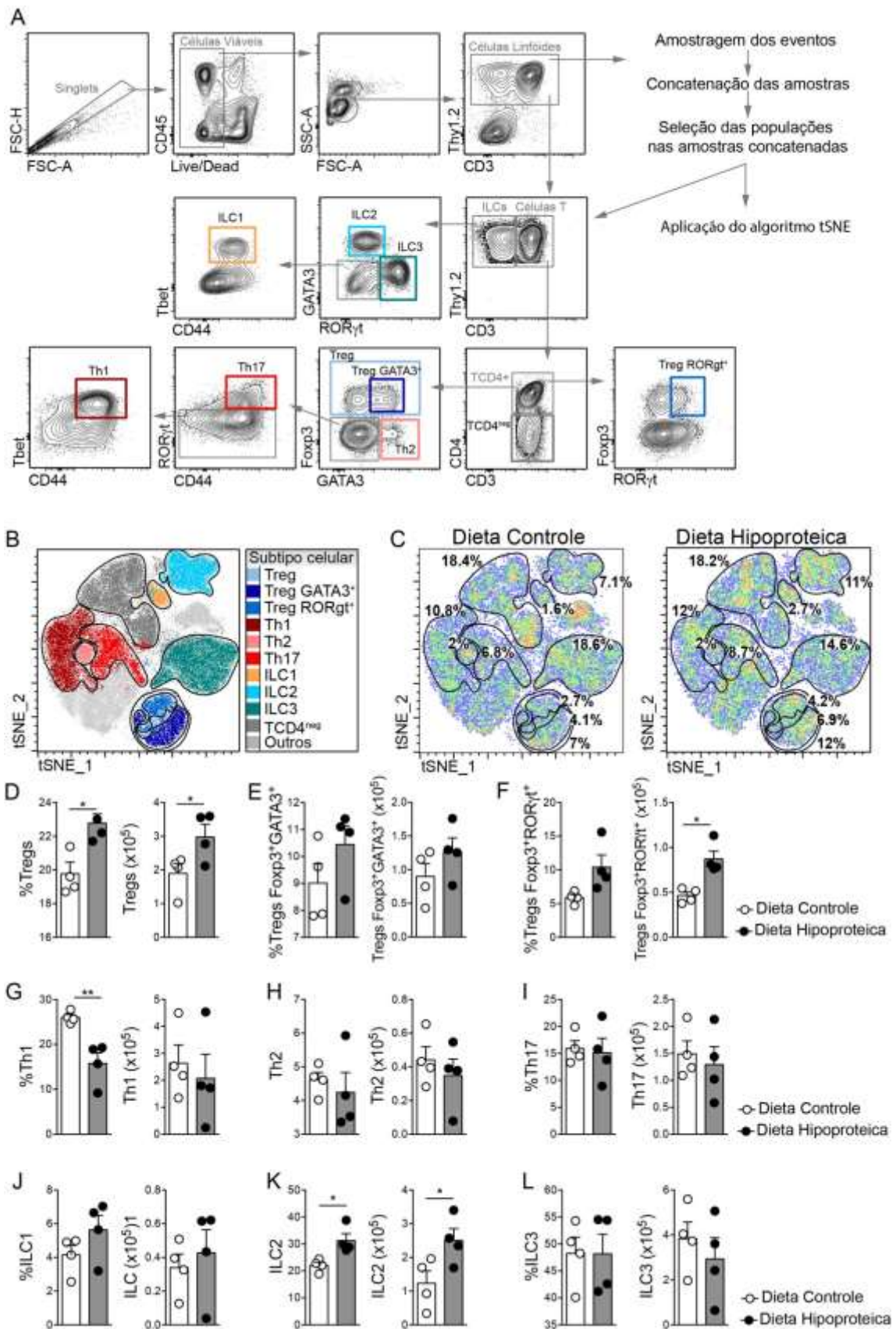


Figura 10: Análise do infiltrado de células linfóides na lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta deficiente em proteínas/lipídeos e baseada em carboidratos por 6 semanas. Ao final deste período, o intestino delgado dos animais foi coletado e processado para análise por citometria de fluxo. Estratégia de análise utilizada para a identificação de leucócitos e das diferentes populações celulares por

citometria de fluxo (A). Análise estocástica tSNE das células mieloides no infiltrado inflamatório intestinal (B,C). O gráfico do tSNE (B) indica as populações celulares em diferentes cores nas amostras concatenadas de acordo com a estratégia de análise em (A) e os gráficos em (C) mostram a frequência de cada uma destas populações delimitadas em amostras concatenadas de cada grupo experimental. As diferentes populações de células linfóides foram analisadas nas amostras individualmente e o resultado foi expresso como média +/- erro padrão da média, número absoluto ou da frequência de cada subtipo celular avaliado dentro da população de linfócitos TCD4⁺ (D-I) ou de ILCs (J-L). Resultados representativos de um experimento, repetido 3 vezes. n=4 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P< 0,01.

Destacamos que as diferenças encontradas nos gráficos de tSNE refletem a distribuição das células dentro da população linfoide (Thy1.2⁺), por isso, avaliamos também os subtipos de linfócitos e ILCs, dentro das populações de TCD4⁺ e ILC, respectivamente (**Figuras 10D-L**). De uma maneira geral, a análise das amostras individualmente, revelou resultados semelhantes ao tSNE, com aumento significativo de o número e da frequência relativa de Tregs e ILC2 em paralelo a uma redução significativa de células Th1 e ILC3 nos animais tratados com a dieta hipoproteica em comparação ao grupo controle (**Figuras 10D, G, K e L**). Embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas, ambas as subpopulações de Treg (GATA3⁺ e ROR γ t⁺) estavam aumentadas na lâmina própria dos animais tratados com a dieta (**Figuras 10E-F**). Os demais subtipos celulares analisados estavam similares entre os grupos experimentais.

Portanto, os resultados apresentados acima mostram que o uso de uma dieta desbalanceada, baseada em carboidratos e deficiente em proteínas e lipídeos, embora não acarrete um quadro de comprometimento significativo, desnutrição ou déficit do desenvolvimento corpóreo do animal, parece alterar a homeostase da mucosa intestinal. Esta alteração está associada a um aumento da presença de um subtipo de DC associado às respostas canônicas intestinais (CD103⁺CD11b⁺), assim como aumento da presença de células Treg e células associadas uma resposta do tipo 2 (Eosinófilos, ILC2 e macrófagos M2). Além disso, a dieta estava associada a uma redução de populações celulares de caráter mais inflamatório, como neutrófilos, monócitos, macrófagos M1, ILC3 e células Th1.

4.4 Impacto da dieta hipoproteica nas diferentes porções do intestino delgado

Até o presente momento, estávamos analisando os efeitos do tratamento com dieta proteica sobre o infiltrado de células da lâmina própria em todo o comprimento

do intestino delgado. Contudo, hipotetizamos que a dieta poderia ter efeitos distintos em diferentes porções do intestino delgado, seja por interferir diretamente sobre as células do sistema imunológico, via alteração de metabólitos locais, por exemplo, ou por seu efeito sobre a microbiota residente. Por isso, nesta etapa do trabalho, dividimos o intestino delgado em 3 porções: proximal, mediana e distal, correspondentes respectivamente a porções enriquecidas de células do duodeno, jejuno e íleo, respectivamente.

Inicialmente realizamos análise histopatológica dos diferentes segmentos intestinais dos animais tratados com as dietas hipoproteica e controle (**Figura 11**). Não verificamos sinais aparentes de processo inflamatório na mucosa intestinal dos diferentes grupos experimentais. No entanto, notamos que a dieta hipoproteica acarretou um aumento significativo no comprimento das vilosidades das porções proximais e distais do intestino, mas não na porção mediana (**Figura 11**).

Devido ao fato de estas alterações não se apresentarem de maneira homogênea ao longo do intestino, sugerimos que a caracterização imunológica pode ter sido influenciada pela utilização do intestino delgado total para a realização da citometria de fluxo. Dessa forma, decidimos analisar as porções proximal, mediana e distal do intestino delgado separadamente (**Figura 12A**). Como existe uma divisão visível a olho nu destas porções, realizamos a divisão pelo comprimento em 3 partes iguais, conforme indicado na **Figura 12A**.

No momento da coleta dos tecidos, realizamos a medição do comprimento total do intestino delgado e notamos uma redução significativa no comprimento do intestino delgado dos animais que receberam a dieta hipoproteica, comparados ao grupo controle (**Figura 12B**). Consequentemente, as três porções do intestino dos animais com a dieta hipoproteica se mostraram menores, visto que dividimos o intestino em três partes iguais (**Figura 12C- E**).

Quando caracterizamos as diferentes populações celulares nas porções proximal e distal (porções que apresentaram alterações morfológicas na análise de histologia) por meio do algoritmo “tSNE”, notamos que algumas populações estavam modificadas com a utilização da dieta hipoproteica, e que estas alterações se apresentaram de forma diferente de acordo com a porção do intestino delgado analisada (**Figura 12G**).

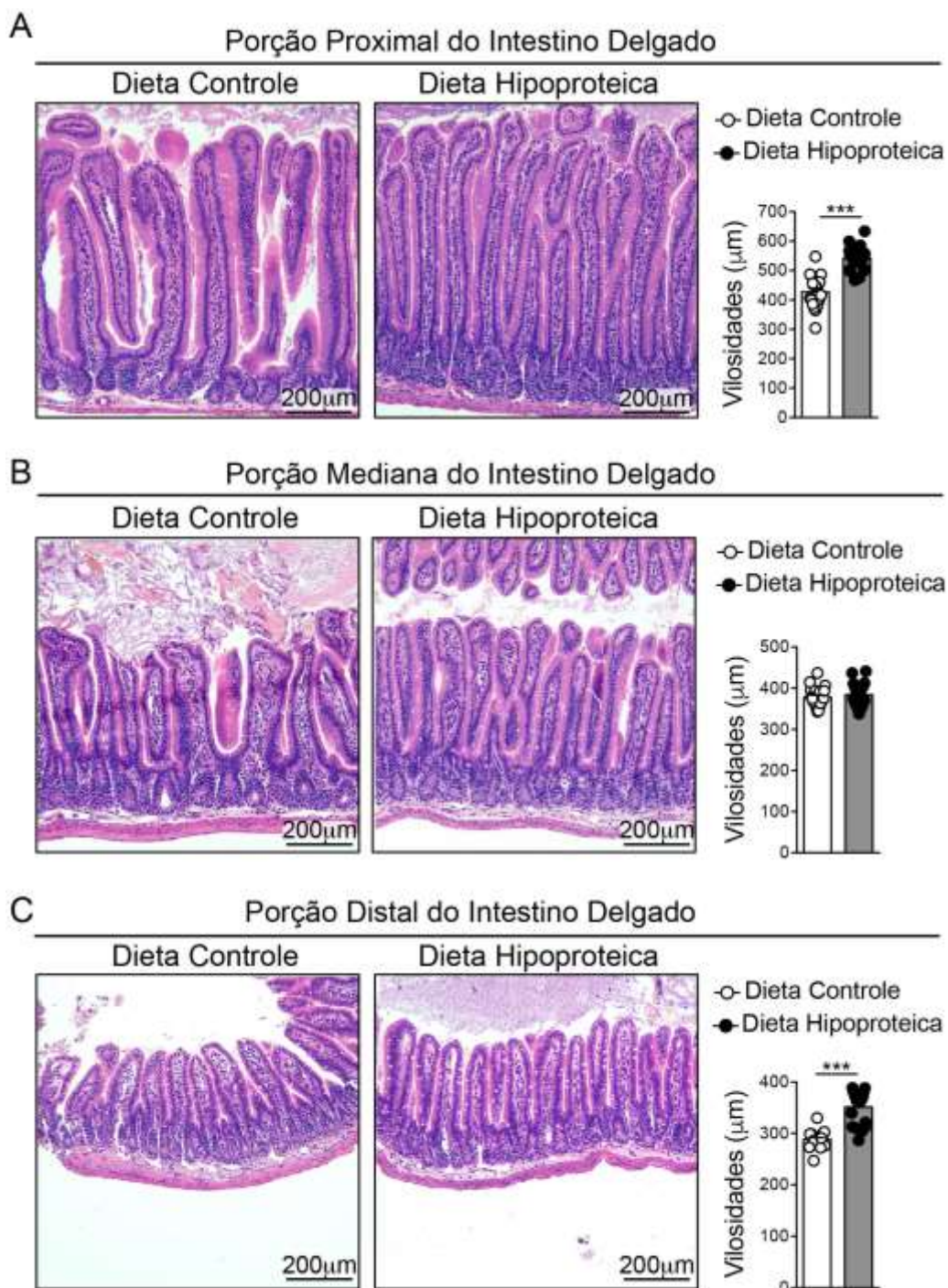


Figura 11: Remodelamento das vilosidades do intestino delgado após a alteração na dieta. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta deficiente em proteínas/lípidos e baseada em carboidratos por 6 semanas. Ao final deste período, o intestino delgado dos animais foi coletado e processado para confecção de lâminas. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos das três porções intestinais: proximal (**A**), mediana (**B**) e distal (**C**) dos diferentes grupos experimentais. Tecidos corados com HE (imagens a esquerda) e quantificação do tamanho das vilosidades em μm nas porções indicadas (gráficos a direita). Os gráficos indicam a média \pm erro padrão da média do tamanho das vilosidades calculado a partir de imagens de 5 cortes diferentes de cada porção. Resultados representativos de um experimento, reproduzido uma vez, $n=4$. *** $P<0.001$.

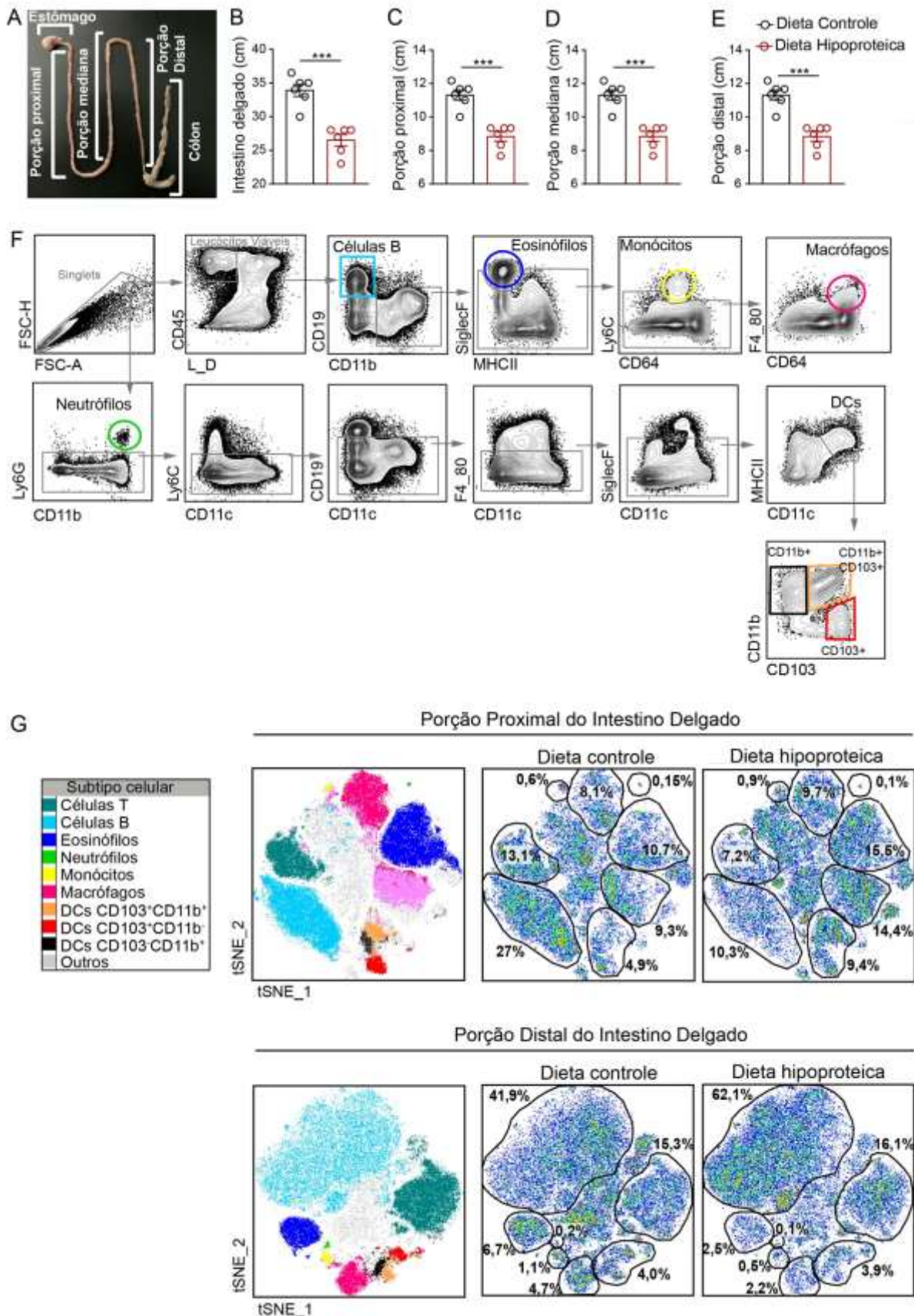


Figura 12: Influência do tratamento com dieta hipoproteica sobre o infiltrado celular da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta pobre em proteínas/lípídeos e baseada em carboidratos por 6 semanas. Ao final deste período, os intestinos delgados foram coletados, separados em porção proximal ao

estômago, equivalente ao duodeno, porção central ou mediana, equivalente ao jejuno, e porção distal ao estômago e proximal ao intestino grosso, equivalente ao íleo (**A**), medidos (**B-E**) e processados para análise por citometria de fluxo (**F-G**). A estratégia de análise utilizada para a identificação de leucócitos e das diferentes populações celulares por citometria de fluxo foi realizada de acordo com o esquema descrito em (**F**). Após análise, foi realizada a amostragem de eventos dentro da população de células CD45+ viáveis, seguida de concatenação de todas as amostras e aplicação do algoritmo tSNE (**G**). Os gráficos da esquerda em (**G**) indicam as diferentes populações celulares em diferentes cores nas amostras concatenadas (conforme as populações indicadas em F) e os gráficos da direita mostram a frequência de cada uma destas populações delimitadas em amostras concatenadas de cada grupo experimental. A frequência representada nos gráficos da direita em (**G**) é relativa à população de leucócitos viáveis. Resultados representativos de um experimento, repetido 2 vezes. n=4-5 animais por grupo experimental.

O uso da dieta desbalanceada aumentou substancialmente as populações de eosinófilos, monócitos e células dendríticas na porção proximal do intestino delgado dos animais tratados com a dieta hipoproteica. Estas mesmas populações diminuíram na porção distal de animais alimentados com a dieta hipoproteica, quando comparados com a dieta controle (**Figura 12G**), sugerindo que as alterações encontradas nas amostras de intestino total estejam refletindo alterações populacionais concentradas na porção proximal do intestino delgado.

Além disso, verificamos uma redução de linfócitos B e T na porção proximal do intestino dos animais com a dieta hipoproteica, paralelamente a um aumento de linfócitos B na porção distal desse grupo experimental, quando comparado ao grupo controle (**Figura 12G**). Nota-se que essas alterações não foram encontradas quando analisamos o intestino delgado total. Sendo assim, seguimos analisando as porções do intestino separadamente.

Quando analisamos quantitativamente os leucócitos nas diferentes porções do intestino, verificamos que o número total de células CD45+ e o número de células CD45+/cm de tecido diminuiu significativamente apenas na porção proximal do intestino do grupo experimental alimentado com a dieta hipoproteica, comparado ao grupo controle (**Figuras 13A-B**). A redução no número de células CD45+/cm de tecido indica que a diminuição do infiltrado celular não ocorreu devido à diminuição do comprimento do tecido, mas possivelmente devido a uma modulação do sistema imunológico.

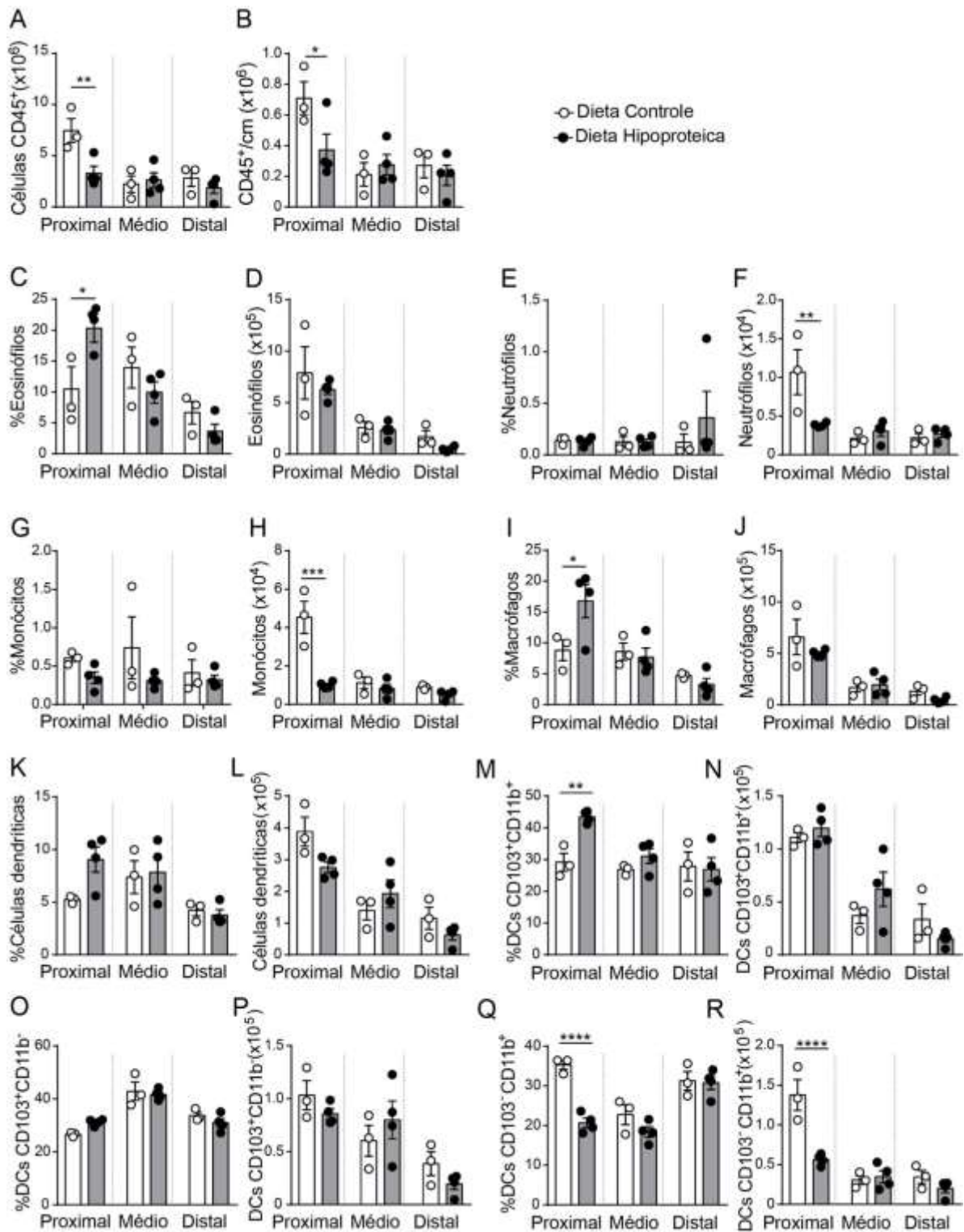


Figura 13: Análise do infiltrado de leucócitos na lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta pobre em proteínas e baseada em carboidrato por seis semanas. Número total de células CD45⁺ (A). Número total de células CD45⁺ por centímetro cúbico (B). Número e frequência de Eosinófilos, Monócitos, Macrófagos, Neutrófilos, e células dendríticas (CD103⁺CD11b⁺, CD103⁺CD11b⁻ ou CD103⁻CD11b⁺) (C-R). Os gráficos C, E, G, I, K indicam a porcentagem relativa de cada subtipo celular na população de leucócitos viáveis CD45⁺, enquanto os gráficos M, O, e Q indicam a porcentagem relativa dentro da população de células dendríticas. Resultados representativos de um experimento, repetido duas vezes. n=4-5 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.

Confirmando alguns dos resultados obtidos na análise por tSNE, o grupo tratado com a dieta hipoproteica exibiu um aumento significativo na frequência de eosinófilos, macrófagos e DCs apenas na porção proximal do intestino em comparação ao grupo controle, embora o número absoluto destas células não tenha sido alterado, possivelmente em função de redução do infiltrado celular total (**Figuras 13C, D e I-L**). No intestino proximal dos animais tratados com a dieta hipoproteica, também houve uma redução significativa do número de neutrófilos e monócitos (**Figuras 13F e H**). Quando analisamos os diferentes subtipos de DCs em frequência relativa à população de DCs (de acordo com a análise na **Figura 12F**), encontramos novamente um enriquecimento significativo da frequência das populações de DC que expressam a molécula CD103 em detrimento daquelas que não expressam esta integrina nos animais que receberam a dieta, quando comparados ao grupo controle (**Figuras 13M-R**). Estas alterações foram encontradas apenas na porção proximal do intestino delgado.

Estes resultados demonstram que multifatorialmente, a dieta hipoproteica parece alterar as células inatas na lâmina própria nas porções proximal e distal. No entanto, quantitativamente, essas alterações são significativas apenas na porção proximal.

Em seguida, utilizamos a análise de tSNE para caracterizar as células linfoides nas porções proximais e distais do intestino delgado (**Figura 14A**). Verificamos um aumento de células inatas dos tipos 2 e 3, ILC2 e ILC3 na porção proximal e uma diminuição na porção distal do intestino delgado dos animais alimentados com a dieta hipoproteica, em comparação ao grupo controle (**Figura 14B**). O mesmo aconteceu com os linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ que estavam diminuídos na porção proximal e aumentados na porção distal do intestino dos animais tratados com a dieta, em comparação ao grupo controle. Apesar desta redução, ainda na análise por tSNE, verificamos um aumento das células dos subtipos Th1 e de células Treg apenas no intestino proximal do grupo experimental com a dieta hipoproteica. Já no intestino distal, detectamos um aumento de ILC1 e uma redução do subtipo Th2 nos animais que receberam a dieta hipoproteica, quando comparados ao grupo controle (**Figura 14B**). Portanto, mais uma vez, percebemos que a dieta hipoproteica foi capaz de modular a resposta tecidual unicamente em cada porção intestinal.

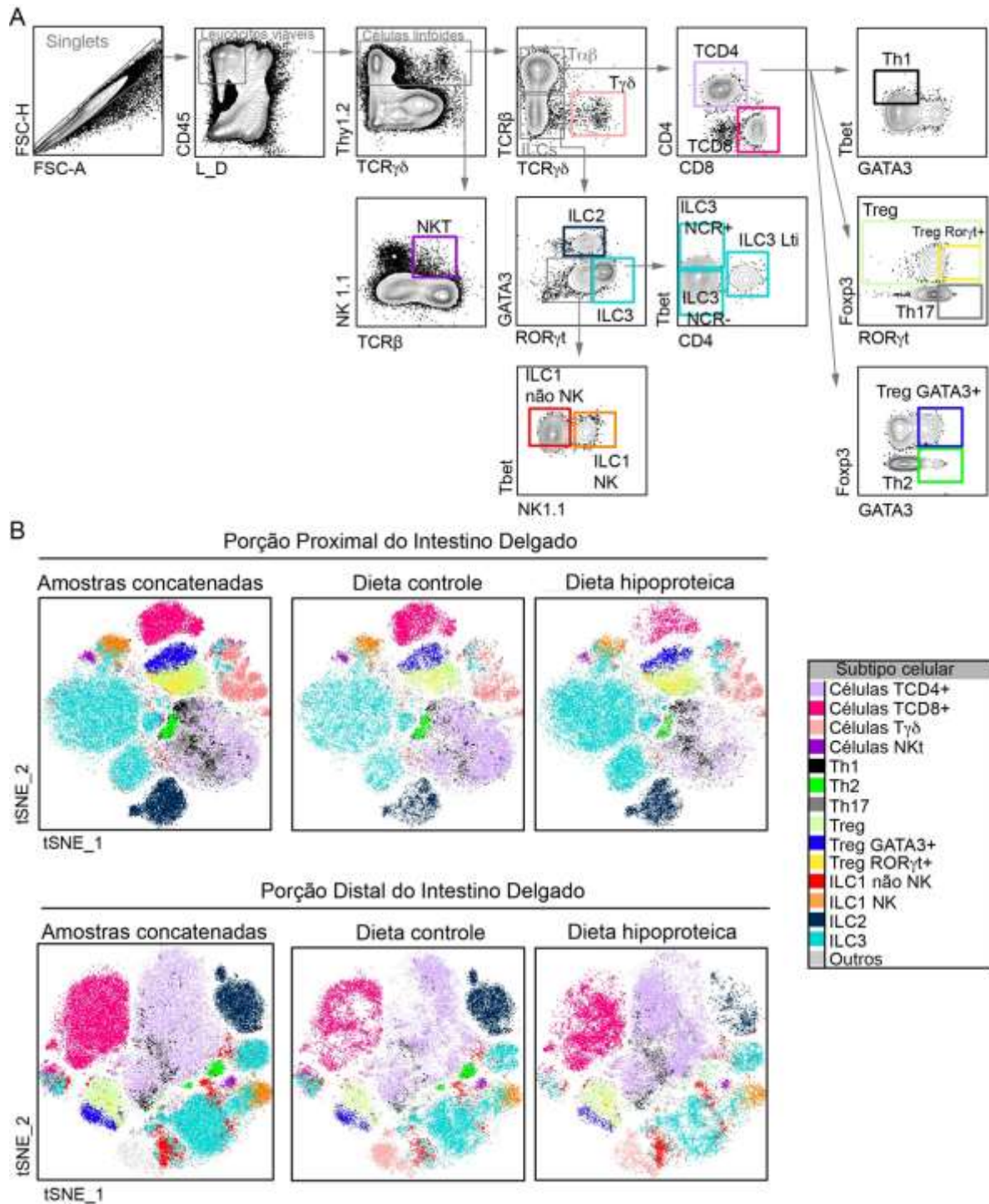


Figura 14: Análise do infiltrado de células linfóides da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta pobre em proteínas/lípídeos e baseada em carboidrato durante 6 semanas. As células das diferentes porções do intestino foram isoladas e analisadas por citometria de fluxo de acordo com a estratégia descrita em (A). tSNE das células presentes no infiltrado inflamatório intestinal (B). Os gráficos da esquerda representam os diferentes tipos celulares nas amostras concatenadas do intestino delgado proximal e distal; os gráficos da direita mostram as amostras concatenadas dos diferentes grupos experimentais, todas possuem o mesmo número de eventos. Resultados representativos de um experimento, repetido duas vezes. n=4-5 animais por grupo experimental.

Analisando quantitativamente todos os subtipos de células linfoides, verificamos uma redução significativa na frequência e no número total de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ na porção proximal do intestino dos animais que receberam a dieta hipoproteica, comparados ao grupo controle (**Figuras 15A-B e O-P**). O número de linfócitos T $\gamma\delta$ também estava significativamente reduzido tanto na porção proximal, quanto na distal nos animais tratados com a dieta hiperlipídica (**Figura 15R**).

Esta redução da população de linfócitos T CD4⁺ na porção proximal do intestino delgado dos animais que receberam a dieta hipoproteica refletiu-se na diminuição do número absoluto de linfócitos T efetores Th1, Th2, Th17 e Treg (**Figuras 15D, F,H,J,L, e N**). Entretanto, quando analisamos proporção de cada um destes subtipos celulares dentro da população de linfócitos T CD4⁺, constatamos que houve um aumento significativo na frequência de células Th17 e de subtipos de Treg avaliados na porção proximal do intestino delgado dos animais tratados com a dieta hiperlipídica (**Figuras 15G, I, K e L**). Esta alteração é coerente com o aumento da frequência das DCs que expressam CD103 e são descritas com as responsáveis pela indução de células Treg e Th17.

Com relação às células linfoides inatas (ILCs), o tratamento com a dieta hipoproteica levou a um aumento significativo da frequência e número de ILCs na porção proximal do intestino delgado, em paralelo a uma redução significativo na porção distal (**Figuras 16A-B**). Esta modulação estava associada a um aumento de ILC1 não NK e ILC2 na porção proximal, em paralelo a uma redução de ILC1 NK e ILC3 nos animais tratados com a dieta, em comparação ao grupo controle (**Figuras 16C-J**).

Outros subtipos de células linfoides também foram avaliados, de acordo com a estratégia de análise descrita na **Figura 14A**, e como não houve diferença significativa nestes outros subtipos de células linfoides, estes dados não serão mostrados.

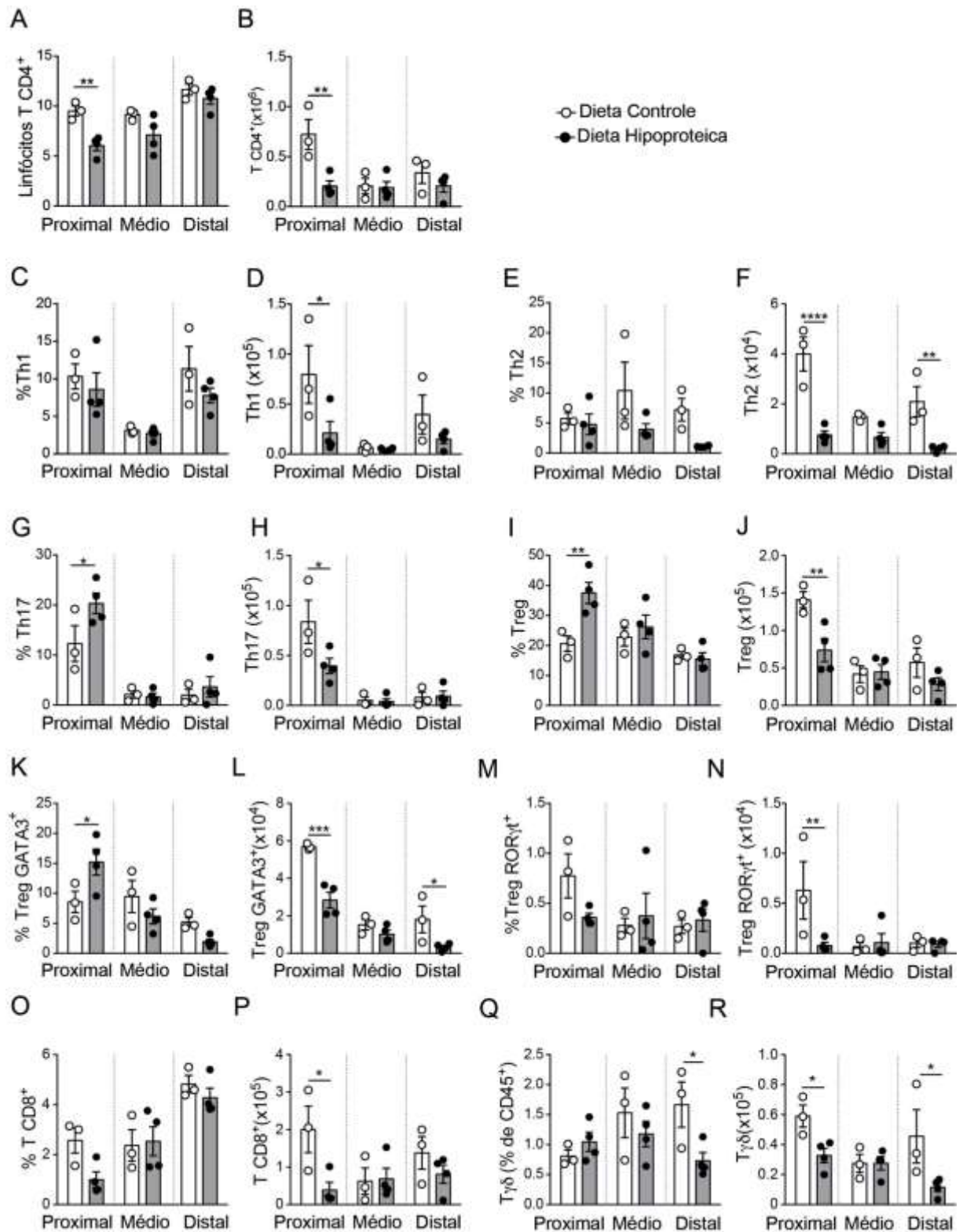


Figura 15: Análise do infiltrado linfóide adaptativo da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados por 6 semanas com uma dieta pobre em proteínas/lipídeos e baseada em carboidrato. Ao final deste período, diferentes porções do intestino foram coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como média +/- erro padrão da média do número absoluto (B,D,F,H,J,L,N,P,R) ou da frequência relativa de cada subtipo celular relativo à população de células CD45+ viáveis (A,M,O,Q) ou T CD4+ (C,E,G,I,J,L). Resultados representativos de um experimento, repetido duas vezes. n=4-5 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.

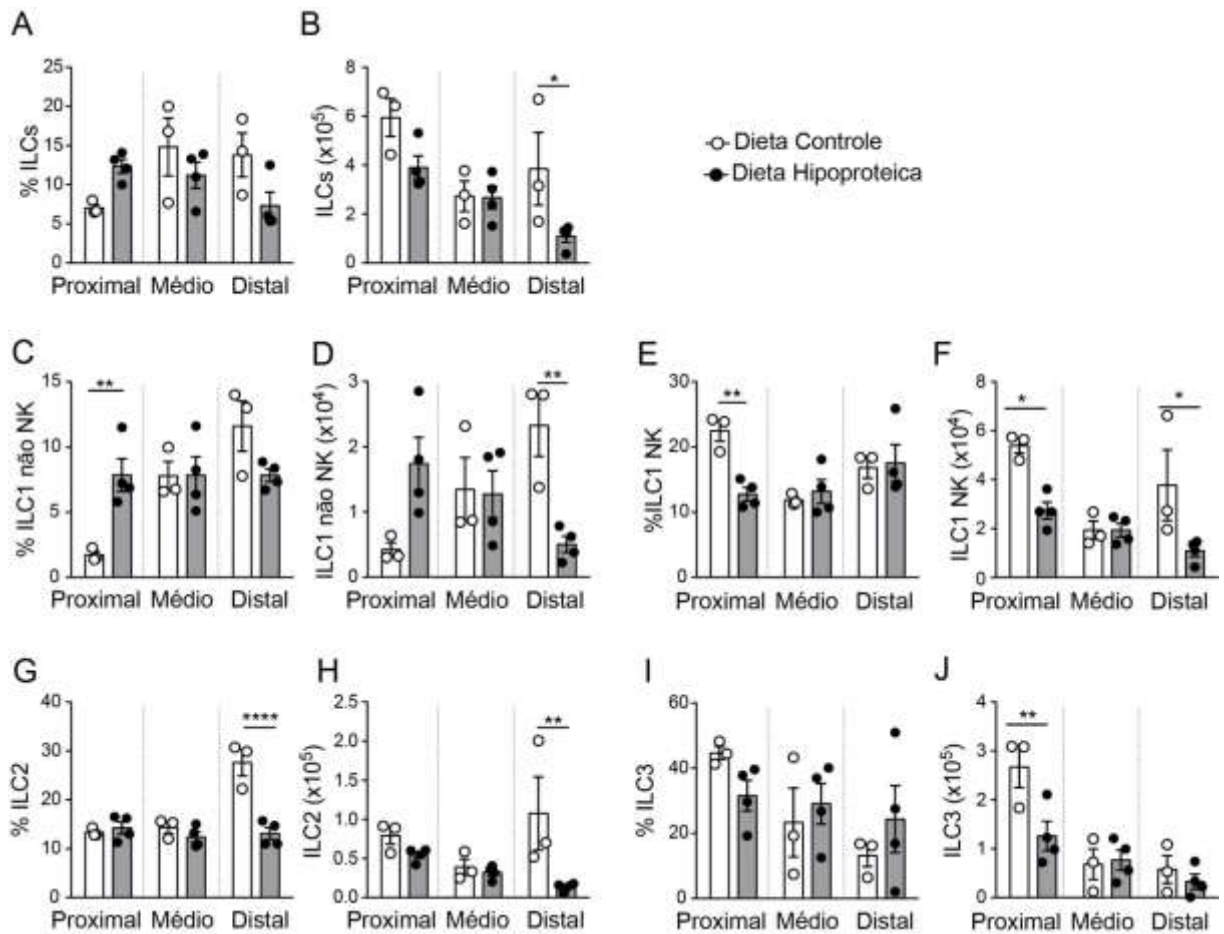


Figura 16: Análise do infiltrado linfóide inato da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com a dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados por 6 semanas com uma dieta pobre em proteínas/lipídeos e baseada em carboidrato. Ao final deste período, diferentes porções do intestino foram coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como média +/- erro padrão da média do número absoluto (B,D,F,H,J) ou da frequência relativa de cada subtipo celular relativo à população de células ILCs (A,C,E,G,I). Resultados representativos de um experimento, repetido duas vezes. n=4-5 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001; ****P< 0,0001.

Esses dados consolidam os resultados encontrados no tSNE e sugerem que a dieta hipoproteica modula a resposta inflamatória no intestino proximal de forma mais significativa do que no intestino distal. Ainda, estes resultados sugerem um desvio de padrão de resposta tecidual após o tratamento com dieta hipoproteica, conferindo ao duodeno um microambiente mais regulador e de padrão Th2, em detrimento da porção correspondente ao íleo.

Para confirmar estes dados, realizamos a análise funcional do infiltrado de células linfóides na lâmina própria dos diferentes segmentos do intestino delgado por meio da detecção de citocinas intracelulares após estímulo com PMA e Ionomicina (Figuras 17 e 18). A análise de tSNE mostrou um aumento da secreção de IL-5 pelas ILCs no intestino proximal em detrimento da secreção dessa citocina no intestino distal

nos animais que receberam a dieta hipoproteica, em comparação à dieta controle. O mesmo aconteceu com a secreção de IL-13 pelos linfócitos T CD4⁺, que aumentou substancialmente na porção proximal do intestino delgado e diminuiu na porção distal após o tratamento com a dieta (**Figuras 17A-B**). Também verificamos uma diminuição da secreção de IFN γ pelos linfócitos T CD4⁺ no intestino proximal, e aumento da secreção dessa citocina por essas mesmas células na porção distal do intestino dos animais tratados com a dieta hipoproteica em comparação ao grupo controle (**Figura 17B**).

A análise quantitativa da produção de citocinas pelos tipos celulares supracitados, mostrou uma redução significativa no número total de linfócitos T CD4 produtores de IFN γ e IL-5 (**Figura 18B e F**) na porção proximal do intestino dos camundongos alimentados com a dieta hipoproteica, comparados ao grupo controle. O número de células produtoras de IL-5 também estava reduzido nas porções distais e medianas do intestino delgado. Como não notamos essa redução na frequência relativa dessas mesmas populações celulares, concluímos que essa alteração refletiu a redução do número total de células na porção proximal do intestino (**Figura 13A**).

Assim como o resultado encontrado na análise de tSNE, notamos que a produção de IL-13 pelos linfócitos TCD4⁺ e por ILCs (**Figuras 18I, K e L**) aumentou significativamente na porção proximal do intestino delgado dos camundongos alimentados com a dieta hipoproteica. Também verificamos um aumento considerável na frequência de produção IL-17 (**Figura 18M**) e uma redução da produção de IL-22 (**Figuras 18Q-T**) por linfócitos T CD4⁺ e ILCs, na porção proximal do intestino dos animais alimentados com a dieta hipoproteica, em comparação ao grupo controle.

Na porção distal do intestino delgado, verificamos uma redução significativa no número de linfócitos TCD4⁺ e de ILCs produtores de IL-5 (**Figura 18F, G e H**) no grupo que recebeu a dieta hipoproteica, em comparação com o grupo controle. Esses dados confirmam a redução do perfil Th2 na porção distal do intestino em condições de baixa ingesta proteica e enriquecimento na porção proximal. Curiosamente, verificamos uma diminuição na produção de IFN γ pelas células ILC1 (**Figura 18C**) na porção mediana do intestino delgado dos animais alimentados com a dieta desbalanceada, comparados ao grupo controle. Entretanto, não foram encontradas outras alterações que sugerissem um efeito inflamatório de perfil Th1 nessa porção intestinal, causado pela mudança da dieta.

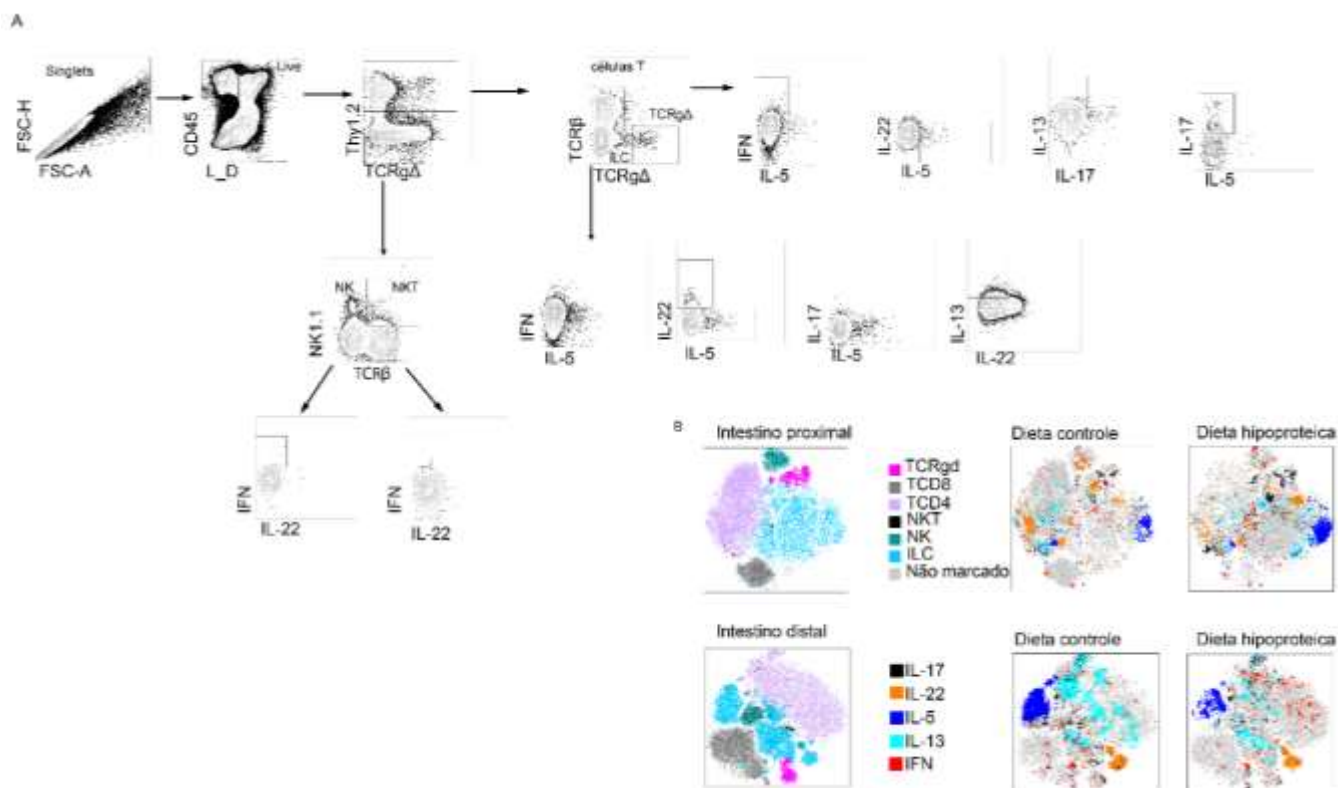


Figura 17: Análise da produção de citocinas por leucócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino de animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta pobre em proteínas/lípídeos e baseada em carboidratos. Após este período as porções proximais, mediana e distais dos intestinos delgados dos animais foram coletadas, os leucócitos da lâmina própria foram isolados e estimulados *in vitro* com PMA e Ionomomicina para a identificação das células linfoides inatas e adaptativas produtoras das citocinas: IFN γ , IL-5, IL-13, IL-17 e IL22. Estratégias de análise utilizadas para a identificação de leucócitos e das diferentes populações celulares por citometria de fluxo (A). tSNE das células produtoras das diferente citocinas (B). Os gráficos da esquerda representam os diferentes tipos celulares de todas as amostras, cuja legenda está disposta na parte superior, os gráficos da direita correspondem à localização de cada citocina (legenda abaixo) sobre as amostras concatenadas de cada grupo experimental. Resultados representativos de um experimento, repetido duas vezes. n=4-5 animais por grupo experimental.

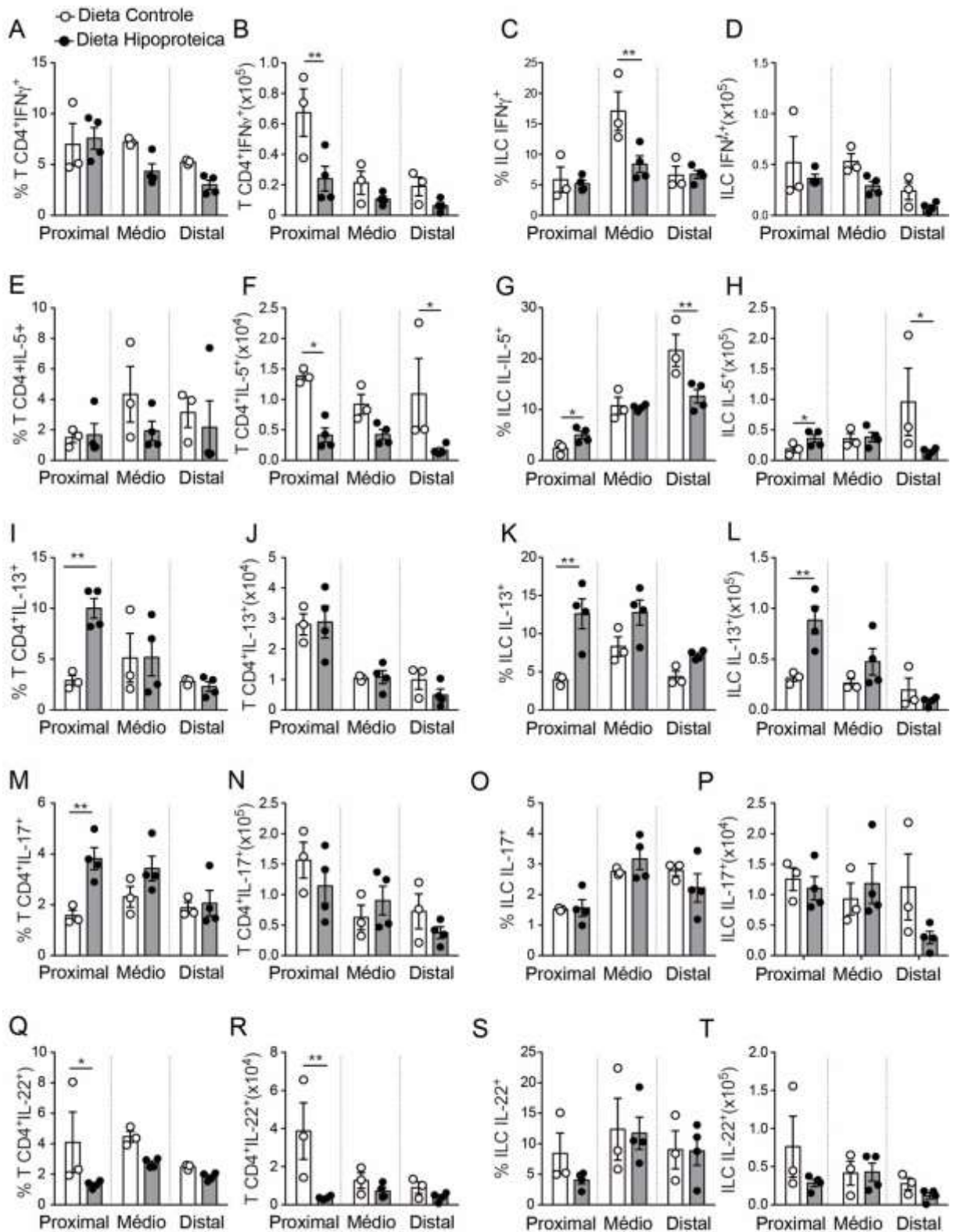


Figura 18: Análise da produção de citocinas por linfócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino de animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram alimentados com uma dieta pobre em proteínas/lipídeos e baseada em carboidratos. Após este período as porções proximal, mediana e distal dos intestinos delgados dos animais foram coletadas, os leucócitos da lâmina própria foram isolados e estimulados *in vitro* com PMA e Ionomicina para a identificação das células linfoides inatas e adaptativas produtoras das citocinas: IFN γ , IL-5, IL-13, IL-17 e IL22 (A-T). Resultados representativos de um experimento, repetido duas vezes. n=4-5 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P< 0,01.

Em decorrência da capacidade da dieta em modular diferencialmente o recrutamento e a ativação das células de padrão 2 (Th2 e ILC2) residentes na mucosa intestinal, avaliamos o impacto funcional desta modulação pela detecção da presença de células caliciformes produtoras de muco no epitélio intestinal. Para tal, lâminas histológicas das porções proximal e distal do intestino delgado foram coradas com coloração ácido periódico e reativo de Schiff ou coloração PAS, utilizada para corar glicoproteínas presentes no muco, em ambos os grupos experimentais. Como é possível verificar na **Figura 19**, houve um aumento na produção de muco nas duas porções do intestino delgado no grupo experimental que recebeu a dieta hipoproteica, comparado com o grupo controle. Para validar este dado, quantificamos as células caliciformes (produtoras de muco) nas porções proximal e distal de ambos os grupos experimentais. Houve um aumento significativo na quantidade dessas células no grupo experimental alimentado com a dieta hipoproteica, comparado com o grupo controle (**Figura 19A e B**). Estes dados corroboram o aumento da produção de IL-13 em ambas as porções intestinais, a despeito da modulação diferencial de outras citocinas e subtipos celulares entre as diferentes porções do intestino.

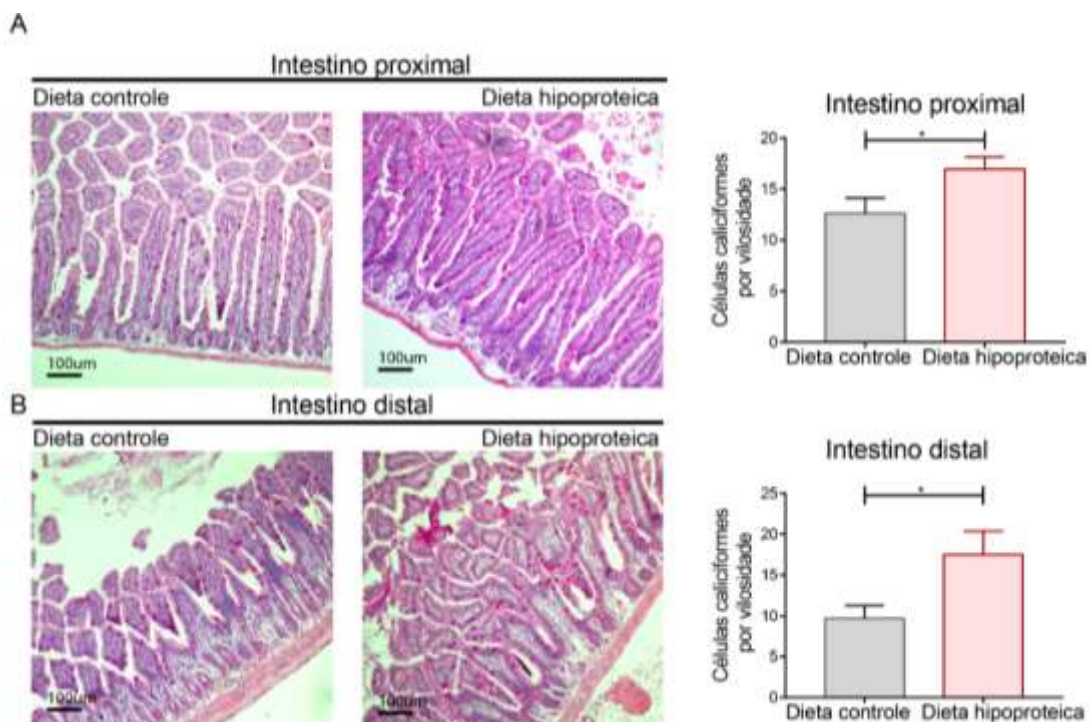


Figura 19: Produção de muco nas porções proximais e distais do intestino delgado após a alteração na dieta. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de duas porções intestinais (proximal em A e distal em B) de animais alimentados por seis semanas com dieta controle ou hipoproteica (a barra representa uma escala de 100µm). Tecidos corados com ácido periódico e reativo de Schiff (imagens a esquerda) e quantificação das células caliciformes nas porções indicadas (gráficos a direita). Resultados representativos de um experimento, reproduzido uma vez, n=4-5 animais por grupo experimental. *P<0,05;

4.5 Influência da dieta sobre a progressão de infecção intestinal aguda

Diante das alterações morfológicas e imunológicas descritas na sessão anterior relacionadas à utilização da dieta hipoproteica, e de que dados prévios do nosso grupo mostraram que a infecção por *Y. pseudotuberculosis* é capaz de causar danos aos vasos linfáticos intestinais e modificar a resposta inflamatória local, decidimos avaliar o impacto de um episódio de infecção aguda no hospedeiro, em um contexto de alimentação desbalanceada. Nesta etapa do trabalho nossa hipótese era de que um episódio de infecção da mucosa intestinal poderia funcionar como gatilho para um processo de inflamação intestinal crônico, decorrente da quebra da homeostase imunológica no intestino induzida pela dieta hipoproteica e hipolipídica. Este fenômeno poderia explicar a etiologia de doenças inflamatórias, como a EE.

Para testar esta hipótese, inicialmente tratamos os camundongos com a dieta hipoproteica por 6 semanas. Antes de os animais começarem a demonstrar diferenças no ganho de peso, realizamos a infecção oral dos animais com um inóculo de *Y. pseudotuberculosis* padronizado por nosso grupo (**Figura 20A**). De acordo com trabalho prévio (FONSECA, et al, 2015), este inóculo é letal para aproximadamente 20% dos animais e, em 80% dos animais, a bactéria é totalmente eliminada do hospedeiro em 2-3 semanas.

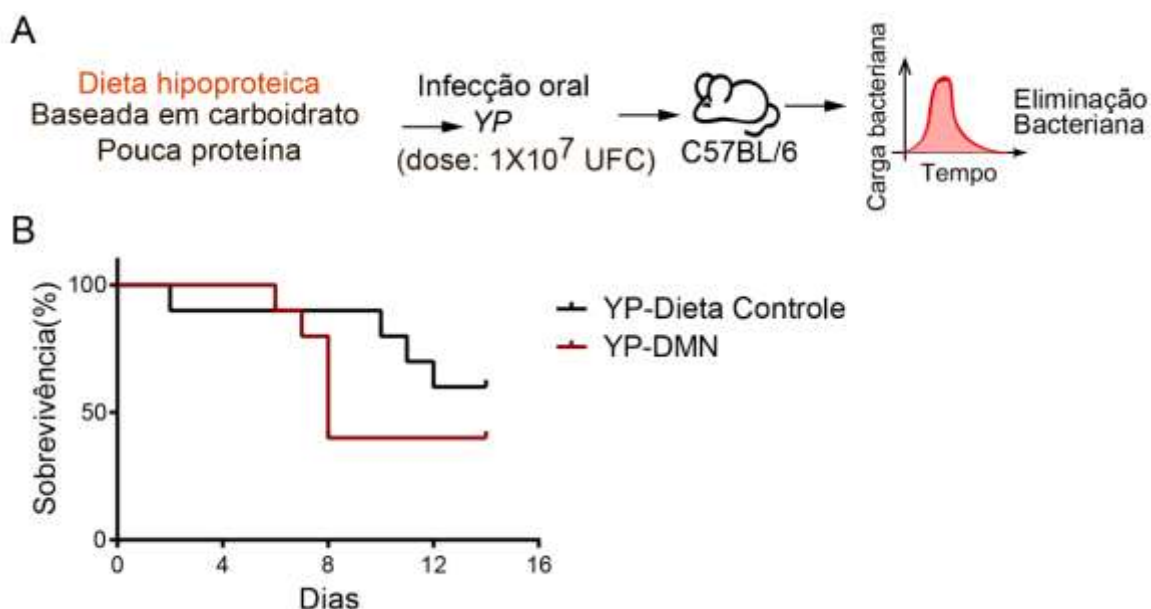


Figura 20: Sobrevivência de animais submetidos à dieta hipoproteica na presença de infecção aguda da mucosa intestinal. Camundongos C57BL/6, com 4 semanas de idade foram tratados com a dieta hipoproteica por 4-6 semanas, e depois infectados pela via oral com 1×10^7 UFC de *Y. pseudotuberculosis* (YP) (**A**). Porcentagem de sobrevivência dos animais ao decorrer de 16 dias após infecção com *Y. pseudotuberculosis* (**B**). Resultados representativos de um experimento, n= 10 animais por grupo.

Verificamos que o inóculo utilizado foi letal para mais da metade dos animais alimentados com a dieta hipoproteica, superando a porcentagem de mortalidade esperada (20%) do grupo que recebeu a dieta controle. Esses dados sugerem que a dieta hipoproteica pode influenciar na resposta imunológica do hospedeiro frente a um episódio de infecção aguda. Destacamos aqui que estes animais não apresentavam sinais de perda de peso ou comprometimento do seu desenvolvimento antes da infecção e não poderiam, portanto, ser considerados desnutridos. É possível que o padrão de alteração da resposta imune na mucosa do intestino para um perfil regulador/Th2 possa comprometer os mecanismos de barreira responsáveis pela eliminação da bactéria, causando o aumento de letalidade.

4.6 Impacto no crescimento e desenvolvimento corporal dos animais tratados com dieta hipoproteica após infecção gastrointestinal

Devido à mortalidade exacerbada mostrada no resultado anterior, que sugere uma ineficiência dos animais alimentados com a dieta hipoproteica em eliminar a bactéria, decidimos repetir o experimento utilizando um inóculo menor de *Y. pseudotuberculosis*. Além disso, com o intuito de simular um ambiente onde o hospedeiro está constantemente exposto a infecções subclínicas, repetimos a infecção por 3 vezes.

Dessa forma, tratamos os camundongos com a dieta hipoproteica por 4 semanas, e antes de os animais começarem a demonstrar diferenças no ganho de peso, nós os infectamos recorrentemente (três vezes, respeitando o tempo de redução da carga bacteriana) com um inóculo 100 vezes menor do que aquele empregado no experimento anterior (1×10^5 UFC) de *Y. pseudotuberculosis* (**Figura 21A**). Acreditávamos que essa dose seria suficiente para “quebrar” da barreira intestinal, sem causar altos índices de mortalidade nos animais e induzir, assim, um processo inflamatório crônico. Importante ressaltar que mantivemos todos os animais sob a mesma dieta durante todo o experimento. Animais tratados com dieta controle e infectados com este inóculo não apresentaram nenhum sinal clínico de doença.

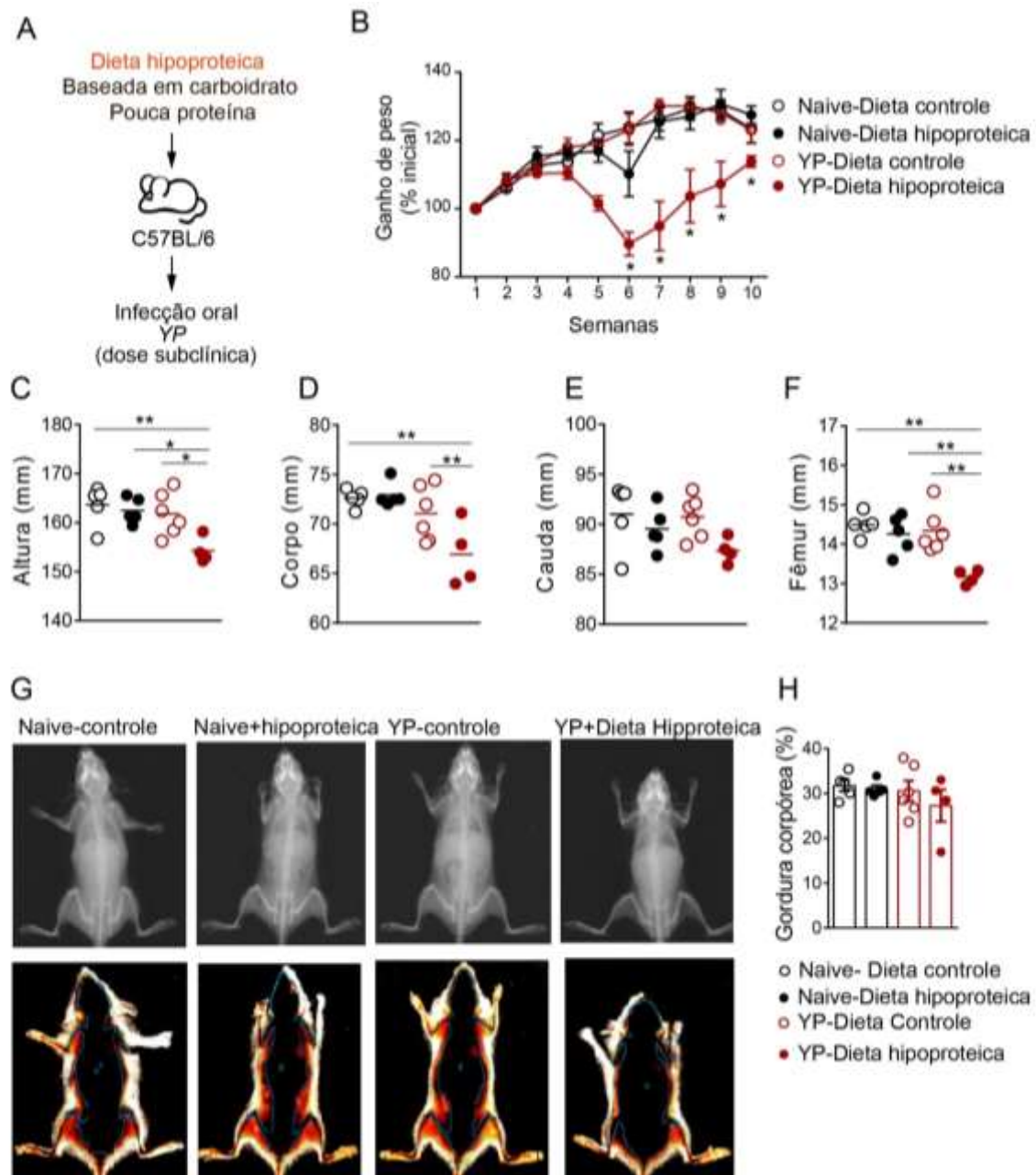


Figura 21: Avaliação do crescimento, desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal de animais submetidos à dieta hipoproteica e infectados com *Y. pseudotuberculosis*. Camundongos C57BL/6, com quatro semanas de idade foram tratados com a dieta hipoproteica por quatro semanas, e depois infectados com uma dose subclínica de *Y. pseudotuberculosis* (YP) 1×10^5 UFC, sendo mantidos na dieta durante todo o experimento (A). Porcentagem de ganho de peso dos animais ao decorrer de 10 semanas de tratamento com a dieta hipoproteica associada à infecção com *Y. pseudotuberculosis* (B). Altura (C), tamanho do corpo (sem a cauda) (D), tamanho da cauda (E) e do fêmur (F) dos animais com dieta hipoproteica e infectados com *Y. pseudotuberculosis*. Imagens representativas de raio X obtida por meio da técnica de imageamento in vivo, de animais dos diferentes grupos experimentais (G). As imagens foram obtidas utilizando raio X com alta energia (filtro de 0.8mm), onde é possível observar as estruturas ósseas e a massa magra. Já as imagens inferiores representam a razão entre duas imagens adquiridas por meio da utilização de raio X com alta energia e de raio X total (sem filtro – 0.0), possibilitando a avaliação da gordura corpórea nos animais. Porcentagem de massa gorda (H). Resultados representativos de um experimento, n=4-6 animais por grupo. *P<0,05; **P< 0,01.

Verificamos que a infecção subclínica sob condição de baixa ingesta proteica e lipídica exacerbou a perda de peso dos animais ao longo do tempo, em comparação aos demais grupos experimentais (**Figura 21B**). Diante desta redução do peso corporal, resolvemos mensurar partes ósseas utilizadas como medidas de desenvolvimento corporal. Houve também uma redução significativa na altura, no tamanho do corpo (sem a cauda), e nos tamanhos da cauda e do fêmur (**Figuras 21C-G**) nos camundongos alimentados com a dieta hipoproteica e infectados, em comparação com os demais grupos.

Utilizando a técnica de imageamento in vivo, também analisamos a diferença na proporção de massa gorda e massa magra desses animais. Não verificamos diferença significativa na porcentagem de gordura corpórea entre os grupos experimentais apesar do grande comprometimento de crescimento corpóreo (**Figuras 21G-H**). Tais dados sugerem que a dieta hipoproteica seguida por episódios subclínicos recorrentes de infecção causa um impacto significativo no crescimento e desenvolvimento ósseo do hospedeiro. Destacamos que os efeitos verificados não foram associados a falhas na eliminação da bactéria visto que ao término do experimento (10 semanas após a primeira infecção), realizamos ensaio de UFC e não detectamos crescimento de bactérias Gram negativas (que incluiria *Y. pseudotuberculosis*) no baço, linfonodos mesentéricos e fígado os animais dos diferentes grupos experimentais que foram infectados (dados não mostrados).

4.7 Alterações estruturais no intestino delgado após a eliminação da infecção subclínica em camundongos submetidos à dieta desbalanceada

Visto que a dieta hipoproteica por si só foi capaz de alterar a morfologia intestinal e que a infecção exacerbou os efeitos da dieta sobre o desenvolvimento corporal, pesquisamos se o mesmo aconteceria com o intestino, ou seja, se a infecção exacerbaria as alterações morfológicas causadas pela dieta hipoproteica.

Para isso, coletamos o intestino delgado após a eliminação da bactéria, para análise histológica (**Figura 22A**). Notamos uma redução significativa no comprimento total do intestino delgado dos camundongos que receberam a dieta hipoproteica e foram infectados com *Y. pseudotuberculosis*, em relação aos grupos naïves tratados com a dieta controle e com a dieta hipoproteica (**Figura 22B**).

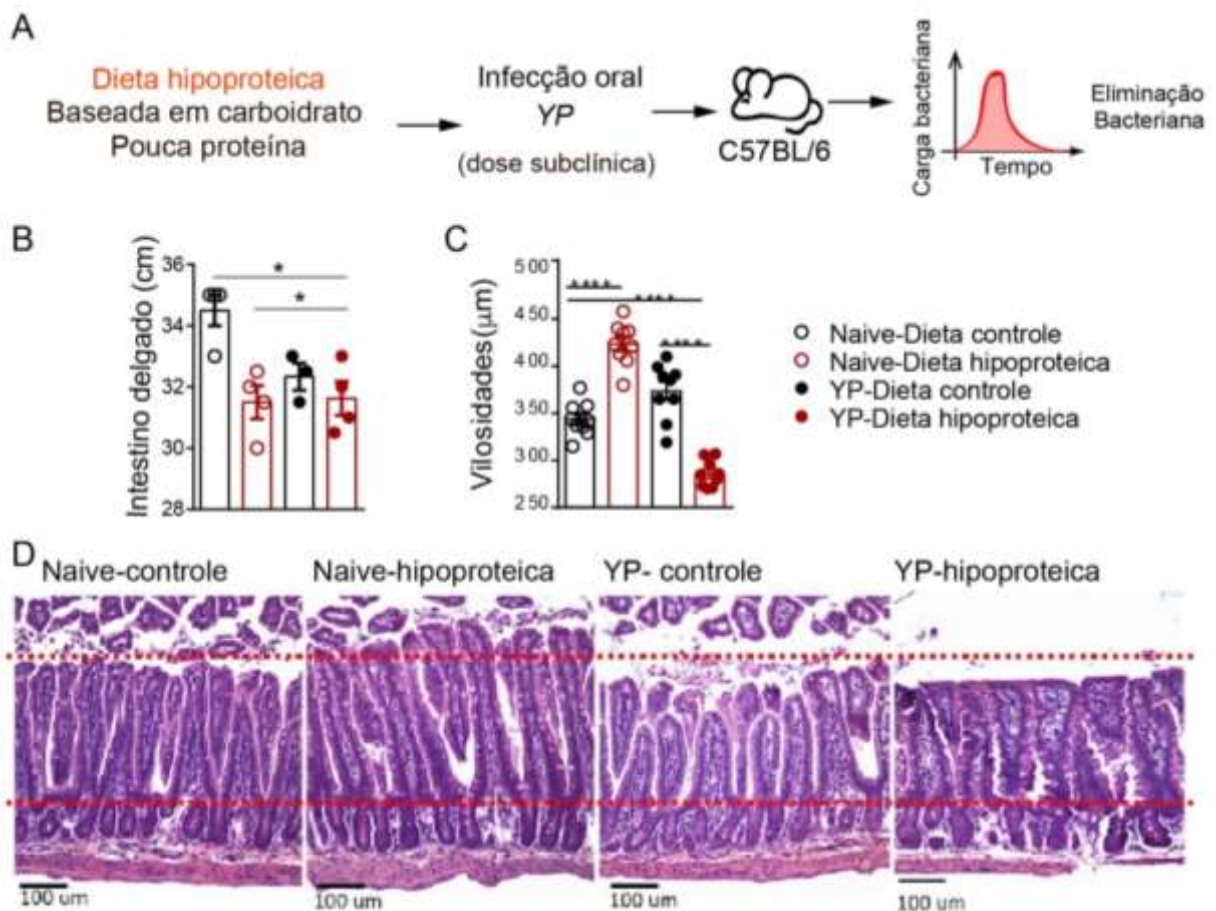


Figura 22: Avaliação das alterações estruturais na porção distal do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica pós infecção. Camundongos C57BL/6 foram tratados com a dieta hipoproteica por 4 semanas, infectados com uma dose subclínica (1×10^5 UFC) de *Y. pseudotuberculosis* (YP), sendo mantidos na dieta durante todo o experimento (A). Tamanho do intestino delgado em centímetros (B) e tamanho das vilosidades intestinais em μm (C), fotomicrografia de cortes histológicos da porção distal do intestino (D) corados com hematoxilina e eosina (a barra representa uma escala de $100\mu\text{m}$) de camundongos naíves e infectados com *Y. pseudotuberculosis*, submetidos à dieta controle e à dieta hipoproteica. Resultados representativos de um experimento reproduzido uma vez, $n=3-4$ animais por grupo. * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$.

Além disso, houve uma redução expressiva no comprimento das vilosidades na porção distal (correspondente ao íleo) do intestino delgado dos camundongos pertencentes ao grupo que recebeu a dieta hipoproteica associada a infecção com *Y. pseudotuberculosis* (Figura 22C-D). Ressaltamos ainda que a o tratamento com a dieta na ausência de infecção novamente causou um aumento do tamanho das vilosidades intestinais, como mostrado anteriormente (Figura 11C). Detectamos também um aumento no infiltrado celular na Lâmina Própria dos camundongos que receberam a dieta hipoproteica e foram posteriormente infectados, comparados aos demais grupos (Figura 22D). Estes dados sugerem que a combinação da dieta

desbalanceada com a infecção subclínica parece causar uma inflamação crônica na porção distal do intestino, resultando em remodelamento do vilo intestinal.

4.8 Caracterização do infiltrado de inflamatório nas porções proximais e distais do intestino delgado pós-infecção em um contexto de dieta desbalanceada

A associação da dieta hipoproteica com episódios recorrentes de infecções com doses subclínicas da bactéria *Y. pseudotuberculosis* impactou significativamente no desenvolvimento corporal e na estrutura morfológica das vilosidades da porção distal do intestino delgado dos camundongos. Sendo assim, analisamos o infiltrado inflamatório das porções proximais e distais do intestino delgado de animais *naïves* e infectados, alimentados com a dieta controle ou com a dieta hipoproteica. Para tal, as células isoladas da lâmina própria do intestino delgado dos animais foram analisadas por citometria de fluxo.

A análise de tSNE das diferentes populações celulares presentes no intestino mostrou que a população de eosinófilos aumentou, não apenas com a utilização da dieta, mas em ambos os grupos infectados, comparados ao grupo controle, apenas na porção proximal do intestino em relação ao grupo *naïve* que recebeu dieta controle (**Figuras 23A-B**). Também detectamos um aumento expressivo nas células dendríticas no grupo alimentado com a dieta hipoproteica, e que essa alteração se manteve nesse grupo após a infecção, apenas na porção proximal do intestino delgado (**Figura 23B**). Paralelamente, na porção distal do intestino delgado, houve um aumento na proporção de linfócitos B nos grupos de camundongos alimentados com a dieta hipoproteica, tanto *naïves* como infectados. Esse aumento não foi notado na porção proximal do intestino (**Figura 23B**). Conforme mostrado anteriormente, o uso da dieta hipoproteica levou a uma redução do infiltrado de neutrófilos na lâmina própria, particularmente na porção distal do intestino. Na presença de infecção existiu um maior recrutamento destas células, que são importantes para a eliminação da bactéria. Contudo, animais tratados com a dieta e infectados exibiram uma redução na população de neutrófilos na porção distal do intestino, em comparação aos animais infectados e alimentados com a dieta controle (**Figura 23B**).

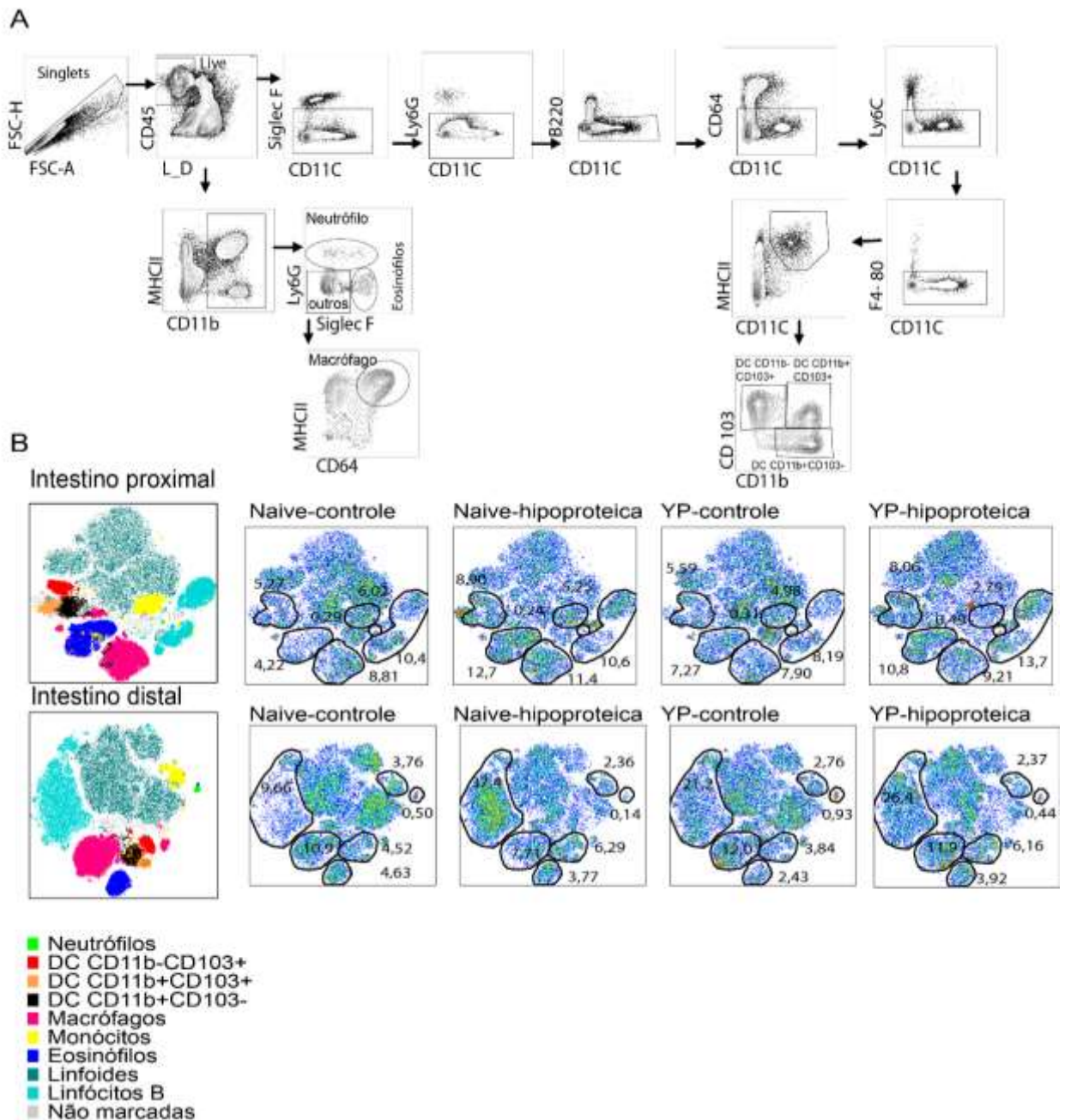


Figura 23: Análise do infiltrado de leucócitos da lâmina própria do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção subclínica recorrente. Camundongos C57BL/6 foram tratados com a dieta hipoproteica por 4 semanas e infectados com uma dose subclínica (1×10^5 UFC) de *Y. pseudotuberculosis* (YP), sendo mantidos na dieta durante todo o experimento. Estratégias de análise utilizadas para isolamento de leucócitos e identificação das diferentes populações celulares por citometria de fluxo (**A**). Análise tSNE das células presentes no infiltrado inflamatório das porções proximal e distal do intestino delgado (**B**). Foi realizada a amostragem e concatenação dos eventos dentro da população de leucócitos CD45⁺ viáveis. Os gráficos da esquerda indicam as diferentes populações celulares em diferentes cores nas amostras concatenadas e os gráficos da direita mostram a frequência de cada uma destas populações delimitadas em amostras concatenadas de cada grupo experimental. Os eixos X e Y, em G, indicam os componentes de análise tSNE1 e tSNE2. Resultados representativos de um experimento. N= 3-6 animais por grupo experimental.

Também realizamos a análise quantitativa dos leucócitos identificados na **Figura 23A**. Não encontramos alteração estatisticamente significativa no número total de células CD45⁺ entre os grupos experimentais, entretanto verificamos que a infecção de animais tratados com a dieta hipoproteica levou a um aumento no número de leucócitos CD45⁺ na lâmina própria da porção proximal do intestino delgado (**Figura 24A**). Quando comparamos os grupos não infectados, submetidos à dieta controle ou hipoproteica, encontramos as mesmas alterações descritas anteriormente. A infecção, mesmo que subclínica, levou a um aumento significativo na frequência e número de neutrófilos na porção distal do intestino delgado em relação ao grupo controle (**Figuras 24B-C**). Este efeito foi parcialmente revertido pelo uso da dieta.

O tratamento com a dieta hipoproteica associada à infecção aumentou significativamente a porcentagem de macrófagos e eosinófilos na porção proximal do intestino delgado, quando comparamos este grupo experimental ao grupo *naïve* alimentado com a dieta controle (**Figura 24G e H**). Ainda nesta porção do intestino delgado, observamos uma redução significativa da população de células dendríticas CD103⁻CD11b⁺ no grupo infectado, alimentado com a dieta hipoproteica, quando comparados ao grupo controle (**Figura 24L**). Assim como os dados mostrados previamente, a dieta desbalanceada sozinha aumentou significativamente a porcentagem de eosinófilos e de células dendríticas (**Figuras 24H e J**) e do subtipo de células dendríticas duplo positivas CD103⁺CD11b⁺ (**Figuras 24P e Q**) na porção proximal do intestino, comparado ao grupo controle.

Curiosamente, notamos apenas uma redução dos números de monócitos (**Figura 24E**) e neutrófilos (**Figura 24C**) e aumento do número total de células dendríticas (**Figura 24K**) e células dendríticas CD103⁻ CD11b⁺ (**Figura 24M**) na porção distal do intestino no grupo infectado, alimentado com a dieta hipoproteica, comparado ao grupo controle. Não houve alteração na frequência relativa destas populações celulares.

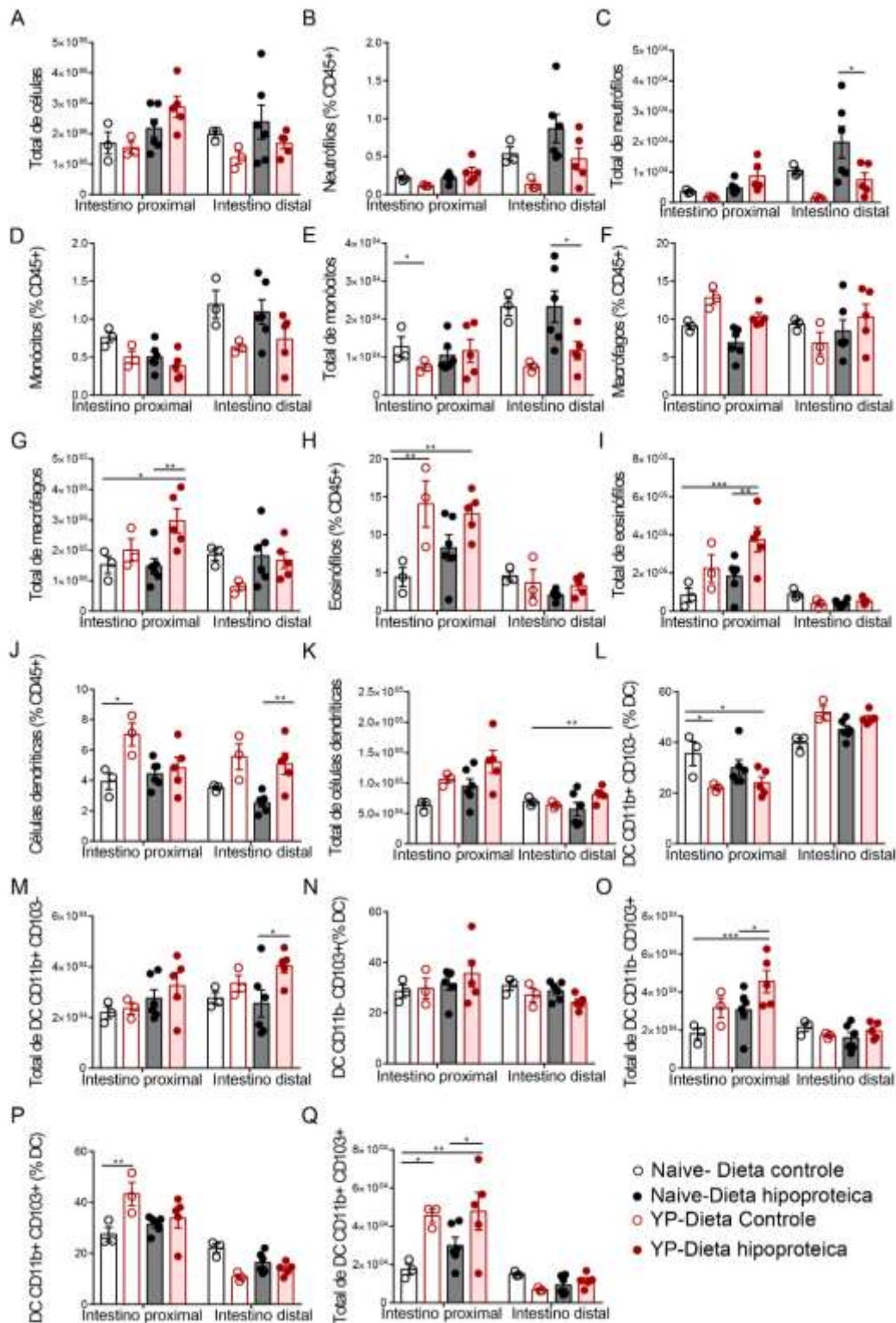


Figura 24: Análise do infiltrado de leucócitos da imunidade inata na lâmina própria do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção subclínica. Camundongos C57BL/6 foram tratados com a dieta hipoproteica por 4 semanas, infectados com uma dose subclínica (1×10^5 UFC) de *Y. pseudotuberculosis* (YP), sendo mantidos na dieta durante todo o experimento. Ao final de 10 semanas de experimento, as porções proximal e distal do intestino delgado foram coletadas para isolamento e caracterização do infiltrado celular na lâmina própria. Os gráficos representam o número e a frequência (dentro das populações indicadas entre parênteses) dos subtipos de leucócitos identificados de acordo com a estratégia de análise descrita na Figura 12A. Resultados representativos de um experimento. n= 3-6 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001.

Em seguida, analisamos quantitativamente as populações de células linfoides em todos os grupos experimentais. Assim como na figura anterior, o tratamento de animais naïves com a dieta, em comparação ao grupo controle, induziu uma redução no número de linfócitos T CD4⁺, em paralelo a um aumento de linfócitos Treg na porção proximal do intestino delgado em comparação ao grupo controle naïve (**Figuras 25A, H-M**). Na porção proximal do intestino delgado, encontramos ainda um aumento significativo no número de células de perfil Th1 (**Figura 25B**), e uma redução significativa na porcentagem de células de perfil Th2 (**Figuras 25D-E**) no grupo experimental que recebeu a dieta hipoproteica e foi infectado posteriormente, comparado ao grupo controle.

Curiosamente, a presença da infecção também reverteu o aumento de células Treg e de Treg co-expressando Foxp3 e GATA3, verificado no grupo que recebeu apenas a dieta, na porção proximal do intestino, em relação ao grupo controle (**Figuras 25H-J**). No entanto, a população de células Treg expressando ROR γ t aumentou expressivamente no grupo tratado com a dieta e infectado, em comparação com o grupo controle, nessa mesma porção do intestino (**Figuras 25L-M**).

Ressaltamos ainda que, apesar de a dieta sozinha reduzir significativamente as células de perfil Th17 no intestino proximal, quando associamos a dieta com a infecção, esse perfil foi reestabelecido, ocorrendo um aumento significativo dessas células, em comparação com o grupo naïve, alimentado com a dieta hipoproteica (**Figuras 25F-G**).

Na porção distal do intestino delgado, verificamos uma redução da porcentagem e do número de linfócitos Th1 (**Figuras 25B-C**), apenas no grupo que recebeu a dieta hipoproteica, em relação ao grupo controle. Também houve uma redução na porcentagem de células Th2 (**Figura 2D-E**) e um aumento no número de células Treg (**Figuras 25H-I**) no grupo infectado e alimentado com a dieta, em relação ao grupo infectado e tratado com a dieta controle.

Quanto aos subtipos de células Treg, o tratamento com dieta hipoproteica, sem infecção, levou a um aumento na frequência de destas células co-expressando Foxp3 e ROR γ t nas porções distal e proximal do intestino em relação ao grupo controle (**Figuras 25L-M**). Também notamos uma redução significativa de Th17 na porção distal do intestino delgado do grupo que recebeu a dieta e foi infectado, comparado ao grupo infectado e tratado com dieta controle (**Figuras 25F-G**). O contrário do fenótipo visto na porção proximal.

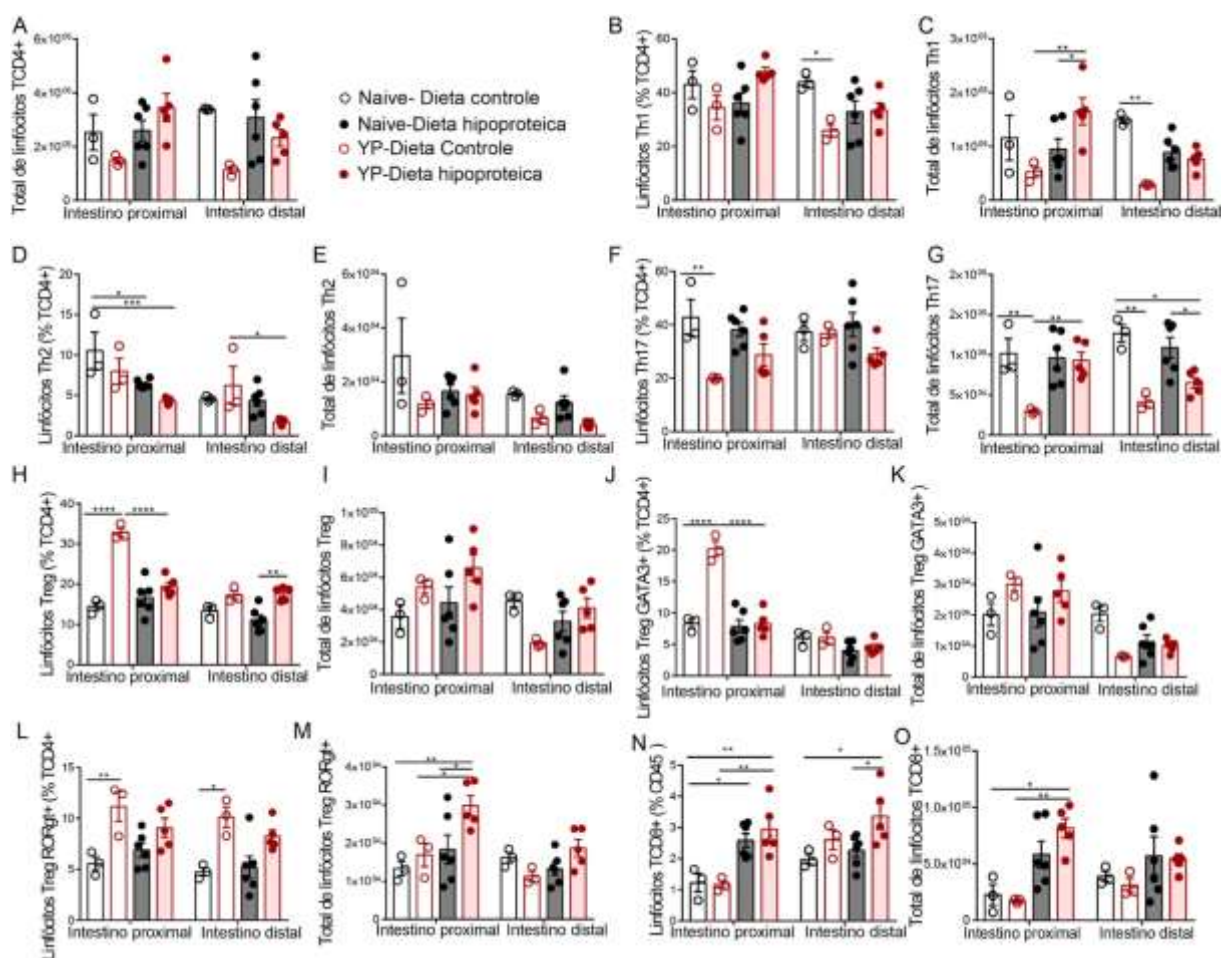


Figura 25: Análise do infiltrado de células linfoides na lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção. Camundongos C57BL/6 foram tratados com a dieta hipoproteica por 4 semanas, infectados com uma dose subclínica (1×10^5 UFC) de *Y. pseudotuberculosis* (YP), sendo mantidos na dieta durante todo o experimento. Ao final de 10 semanas de experimento, as porções proximal e distal do intestino delgado foram coletadas para isolamento e caracterização do infiltrado celular na lâmina própria. Os gráficos representam o número e a frequência (dentro das populações indicadas entre parênteses) dos subtipos de leucócitos identificados de acordo com a estratégia de análise descrita na Figura 14A. Resultados representativos de um experimento. n= 3-6 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001; ****P< 0,0001.

Analisando outros tipos celulares, notamos que a frequência de células T CD8⁺ aumentou significativamente na porção proximal do intestino dos animais tratados com a dieta, independentemente da presença da infecção. Contudo, houve aumento significativo na frequência de T CD8⁺ na porção distal do intestino dos animais tratados com a dieta hipoproteica e infectados com a bactéria *Y. pseudotuberculosis*, em comparação aos demais grupos (**Figuras 25N-O**). De uma maneira geral, por se tratar de uma infecção subclínica, as alterações do infiltrado celular encontradas no grupo infectado foram discretas em comparação ao grupo controle, porém o uso da dieta

levou ao aumento do infiltrado inflamatório, não apenas na porção proximal, como também na distal.

Na sequência, caracterizamos as populações de células linfoides inatas e observamos que a porcentagem e o número das ILCs do tipo 1 aumentou significativamente (**Figuras 26A-B**) no intestino proximal do grupo infectado e tratado com a dieta hipoproteica, comparado ao grupo que recebeu apenas a dieta hipoproteica. Ainda na porção proximal do intestino delgado, notamos uma redução na porcentagem de ILC2 e ILC3 neste mesmo grupo experimental (**Figuras 26C-F**), comparado ao grupo que recebeu apenas a dieta.

Quando analisamos a porção distal do intestino delgado, notamos que a dieta hipoproteica associada à infecção também aumentou a frequência de ILC1 (**Figuras 26A-B**), comparado ao grupo controle. Também verificamos que a dieta (sem infecção) aumentou expressivamente a porcentagem de ILC2 nessa porção intestinal, entretanto, quando infectados, os animais mostraram um fenótipo contrário (**Figuras 26C-D**). Além disso, houve uma redução significativa de ILC3 na porção distal dos animais tratados com a dieta e posteriormente infectados, comparados ao grupo controle (**Figuras 26E-F**).

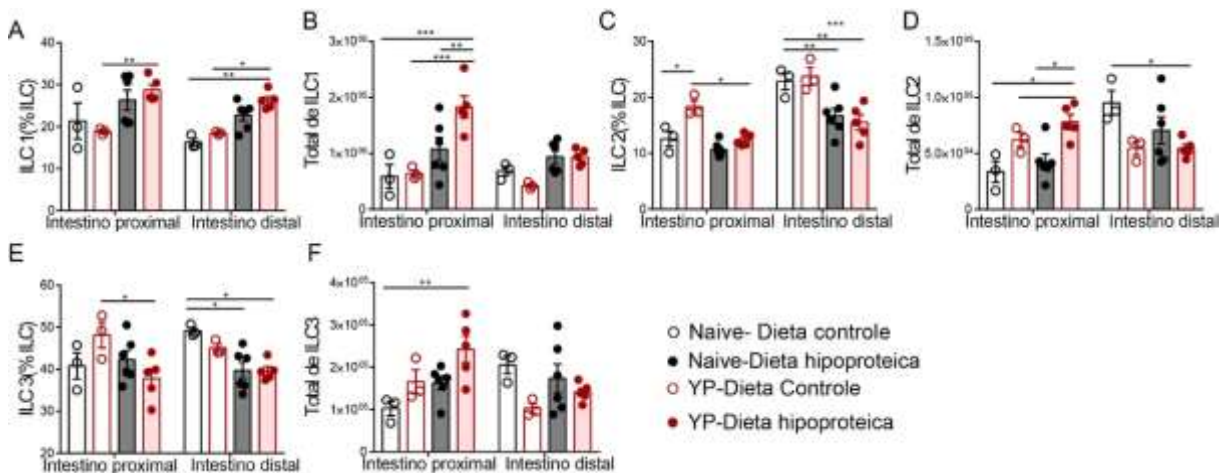


Figura 26: Análise do infiltrado linfoide da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção. Camundongos C57BL/6 foram tratados com a dieta hipoproteica por 4 semanas, infectados com uma dose subclínica (1×10^5 UFC) de *Y. pseudotuberculosis* (YP), sendo mantidos na dieta durante todo o experimento. Ao final de 10 semanas de experimento, as porções proximal e distal do intestino delgado foram coletadas para isolamento e caracterização do infiltrado celular na lâmina própria. Os gráficos representam o número e a frequência (dentro das populações indicadas entre parênteses) dos subtipos de leucócitos identificados de acordo com a estratégia de análise descrita na Figura 14A. Resultados representativos de um experimento. n= 3-6 animais por grupo experimental. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Para finalizar a caracterização das células imunológicas nos grupos experimentais, analisamos a produção de diferentes citocinas pelos linfócitos TCD4⁺, ILCs e TCD8⁺ (**Figura 27A**). A produção de IFN γ pelos linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e pelas ILCs aumentou significativamente em ambas as porções intestinais no grupo experimental que recebeu a dieta hipoproteica seguida pela infecção, comparado ao grupo controle (**Figuras 27B-G**). Já produção de IL-5 por células TCD4⁺ foi reduzida apenas na porção distal, e por ILCs foi reduzida em ambas as porções, nesse mesmo grupo, também em comparação com o grupo controle (**Figuras 27H-K**). Quanto à produção de IL-13, notamos uma redução significativa nas células TCD4⁺ na porção proximal do intestino, e também pelas ILCs, na porção distal do intestino no grupo infectado e alimentado com a dieta hipoproteica, comparado ao grupo controle (**Figuras 27L-O**). A produção de IL-17 foi expressivamente reduzida, apenas na porção distal do intestino delgado, tanto pelas células T CD4⁺, quanto pelas ILCs do grupo infectado e alimentado com a dieta hipoproteica, comparado ao grupo com a dieta controle (**Figuras 27P-Q**). Quanto à citocina IL-22, sua produção foi reduzida pelas células T CD4⁺, em ambas as porções do intestino, do grupo infectado e tratado com a dieta, comparado ao grupo infectado e mantido na dieta controle (**Figuras 27R-T**). Nas ILCs, a produção de IL-22 aumentou na porção proximal desse grupo experimental, comparado ao grupo que recebeu apenas a dieta.

Esses dados sugerem um aumento do infiltrado inflamatório de perfil Th1 em ambas as porções intestinais, bem como uma redução de Th2, principalmente na porção distal do intestino após a infecção de animais tratados com dieta hipoproteica. Além disso, as respostas protetoras por Th17 e ILC3 parecem ser comprometidas pela dieta. Portanto, os animais tratados com a dieta e infectados podem desenvolver um desbalanço das respostas canônicas na mucosa intestinal, que podem comprometer a imunidade da mucosa intestinal mesmo diante de episódios subclínicos de infecção. Em função disso, a infecção subclínica por *Y. pseudotuberculosis* em animais previamente tratados com dieta desbalanceada (hipoproteica/hipolipídica) levou a um comprometimento do desenvolvimento corpóreo, que acreditamos estar associado a presença de um infiltrado inflamatório na mucosa intestinal.

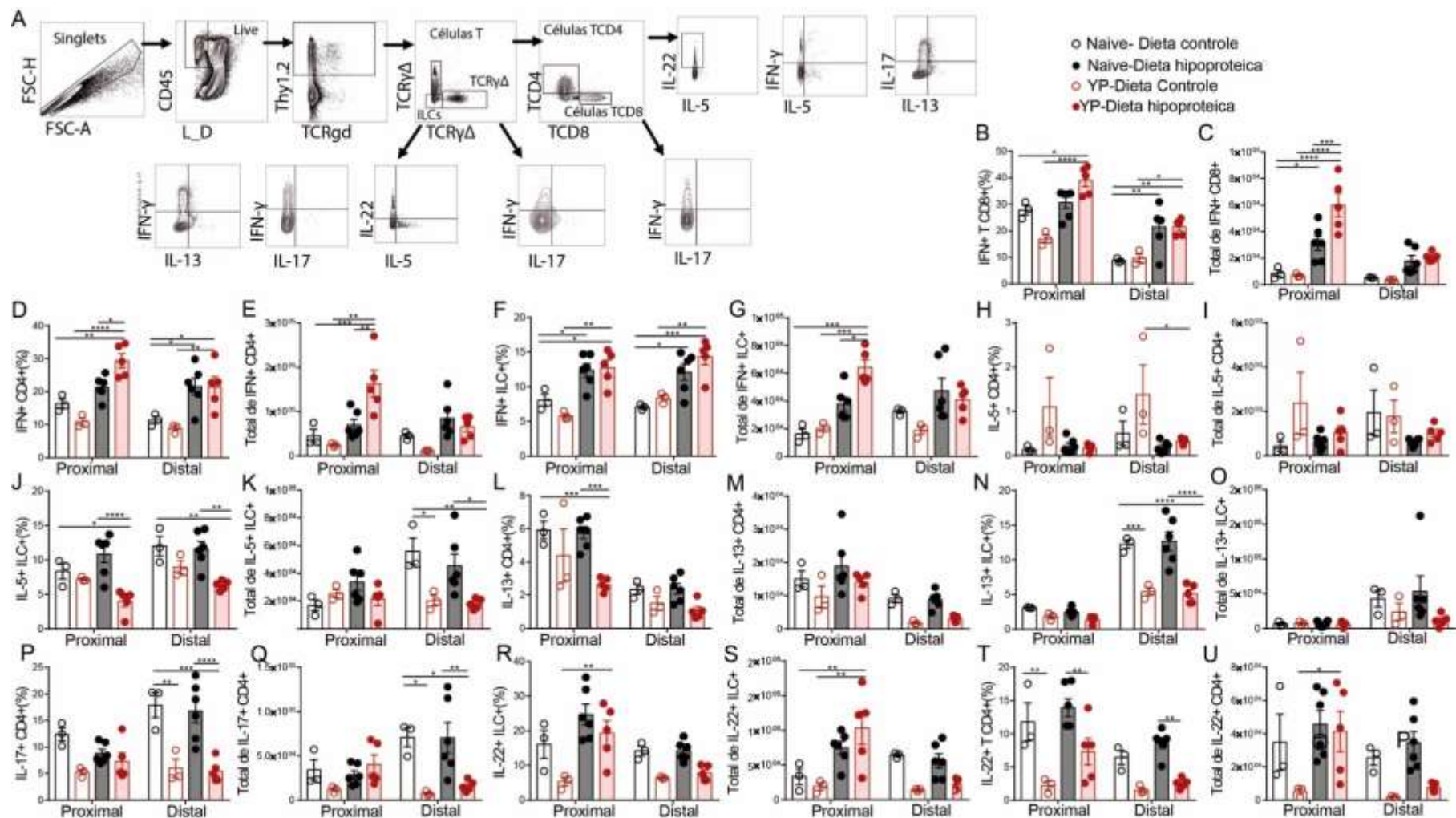


Figura 27: Análise da produção de citocinas por linfócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção. Camundongos C57BL/6 foram tratados com a dieta hipoproteica por 4 semanas, infectados com uma dose subclínica (1×10^5 UFC) de *Y. pseudotuberculosis* (YP), sendo mantidos na dieta durante todo o experimento. Os leucócitos foram isolados dos diferentes tecidos e analisados por citometria de fluxo para identificação das diferentes populações celulares produtoras de citocinas. Estratégias de análise utilizadas para a identificação das populações celulares (A). Frequência e número de células produtoras das citocinas IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17, IL-22 (B-U). Resultados representativos de um experimento. n= 3-6 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001; ****P< 0,0001.

4.9 As alterações na estrutura intestinal após alteração na dieta e infecção por *Y. pseudotuberculosis* não são consequências de uma infecção ativa

Como encontramos alterações significativas no desenvolvimento corporal e no infiltrado celular na lâmina própria dos animais que foram tratados com a dieta hipoproteica e posteriormente infectados, verificamos se os dados encontrados não seriam resultantes da ineficiência do organismo em eliminar a bactéria, culminando em uma infecção ativa.

Para tal, analisamos a presença de bactérias no fígado, baço e linfonodo mesentérico por meio contagem de UFC nos diferentes tecidos (**Figura 28A**). O homogenato tecidual foi plaqueado em diferentes meios de cultura (MacConkey e BHI) com o intuito de verificarmos o crescimento de bactérias *gram* positivas (possivelmente microbiota intestinal) e *gram* negativas (possivelmente *Y. pseudotuberculosis*). Encontramos infecção ativa (crescimento de bactérias *gram* negativas em meio MacConkey) em apenas um dos animais infectados que receberam a dieta hipoproteica (**Figura 28C**) e, notavelmente, também encontramos a translocação de bactérias intestinais (crescimento em BHI, mas não em MacConkey) apenas nesse grupo experimental (**Figura 28B**).

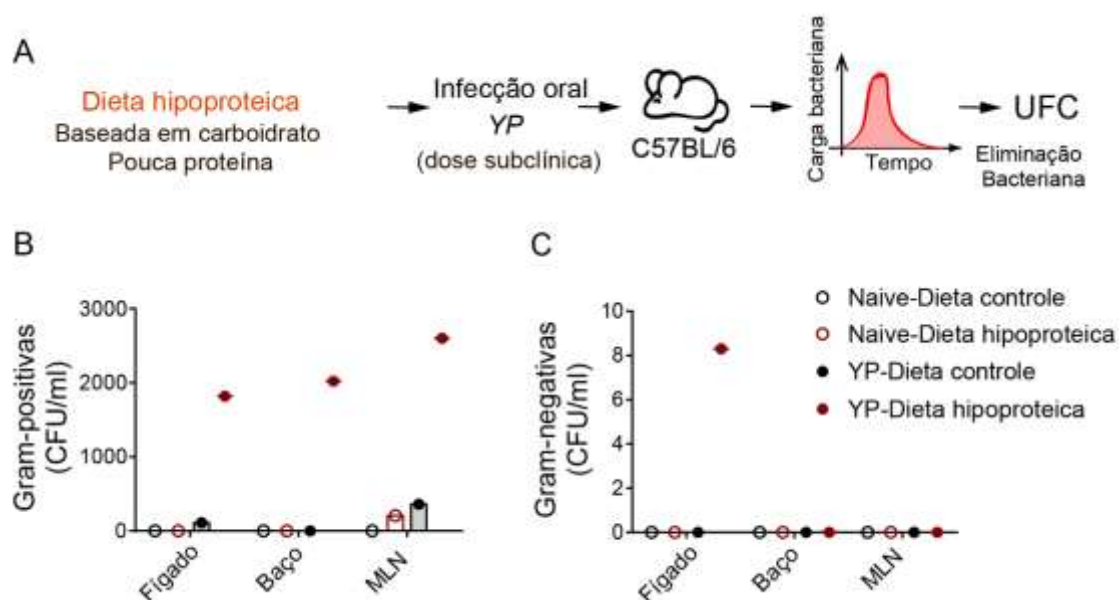


Figura 28: Avaliação da presença de infecção ativa e de translocação bacteriana em camundongos submetidos à dieta hipoproteica e posteriormente infectados com *Y. pseudotuberculosis*. Camundongos alimentados com a dieta hipoproteica e infectados após quatro semanas de dieta submetidos à técnica de UFC (A). Contagem de UFC de bactérias que cresceram no meio de cultura BHI, mas não no MacConkey e foram consideradas gram positivas (B), e de bactérias que cresceram apenas no meio de cultura MacConkey e foram consideradas gram negativas (C), no fígado, baço e linfonodo mesentérico de camundongos

submetidos à dieta controle e hipoproteica, naives e infectados. Resultados representativos de um experimento, n=3-6 animais por grupo.

Diante destes resultados, concluímos que o impacto da associação dieta-infecção não foi resultante de uma infecção ativa e sugerimos que essa associação parece causar um aumento da permeabilidade intestinal, mesmo após o controle bacteriano. Experimentos são necessários para concluirmos se esta translocação bacteriana é decorrente do aumento de permeabilidade linfática ou do epitélio intestinal. Acreditamos ainda que a translocação bacteriana aumentada pode levar a um ciclo vicioso, no qual a desorganização da barreira intestinal pode aumentar a exposição a patobiontes.

4.10 Influência da microbiota modificada por episódios de infecção gastrointestinal sobre o crescimento e desenvolvimento de camundongos submetidos à dieta hipoproteica

Dados prévios do nosso grupo mostraram que a infecção com *Y. pseudotuberculosis* pode causar alterações na composição da microbiota intestinal, como aumento das populações de Verrucomicrobia e Proteobacteria (FONSECA et al., 2015). De acordo com esses resultados e com dados prévios da literatura que demonstram a importância da microbiota em processos metabólicos que influenciam nos estados de desnutrição e obesidade (RIDAURA et al., 2013; WEN e WONG, 2017), iniciamos um protocolo de transplante fecal (FMT) para verificarmos a influência da microbiota alterada por um episódio de infecção gastrointestinal pela bactéria *Y. pseudotuberculosis* no crescimento e desenvolvimento dos camundongos em condições de diminuição da ingesta proteica pelo tratamento com a dieta desbalanceada.

Para tal, realizamos um transplante de microbiota fecal (FMT, do inglês, *Fecal Matter Transplantation*) de camundongos naives e de camundongos previamente infectados com *Y. pseudotuberculosis* (depois da eliminação da bactéria) para camundongos recém desmamados (com três semanas de vida) e submetidos à dieta hipoproteica (**Figura 29A**). Após o transplante de microbiota fecal dos animais naives ou previamente infectados para camundongos jovens (3 semanas de idade) notamos um aumento no ganho de peso dos animais que receberam o FMT dos animais previamente infectados em relação aos animais

naives, mesmo alimentados com a dieta desbalanceada (**Figura 29B**). Notamos que apesar do aumento na porcentagem de ganho de peso, esses animais apresentaram uma redução significativa das medidas relacionadas ao desenvolvimento ósseo (**Figuras 29D-G**).

Além disso, quando avaliamos a diferença na proporção de massa gorda e massa magra, foi encontrado um discreto aumento, na porcentagem da área de gordura corporal no grupo de animais com dieta hipoproteica que recebeu microbiota de animais previamente infectados com *Y. pseudotuberculosis* comparado aos demais grupos (**Figuras 29C**).

Esses dados sugerem que a microbiota alterada pela infecção com *Y. pseudotuberculosis* sozinha não foi responsável pelo fenótipo apresentado em um contexto de infecção entérica e desbalanço de dieta. Portanto, é necessária a presença do patógeno para que ocorra o comprometimento do desenvolvimento corpóreo durante o uso da dieta hipoproteica/hipolipídica. Acreditamos que tal fato se deva ao desenvolvimento de processo inflamatório intestinal crônico que compromete a absorção de nutriente. O gatilho para tal fenômeno seria desencadeado pela infecção, que se desenvolve de maneira diferente nos animais tratados com a dieta hipoproteica/hipolipídica, devido à modulação do sistema imunológico associado à mucosa intestinal, conforme descrito no item 4.8.

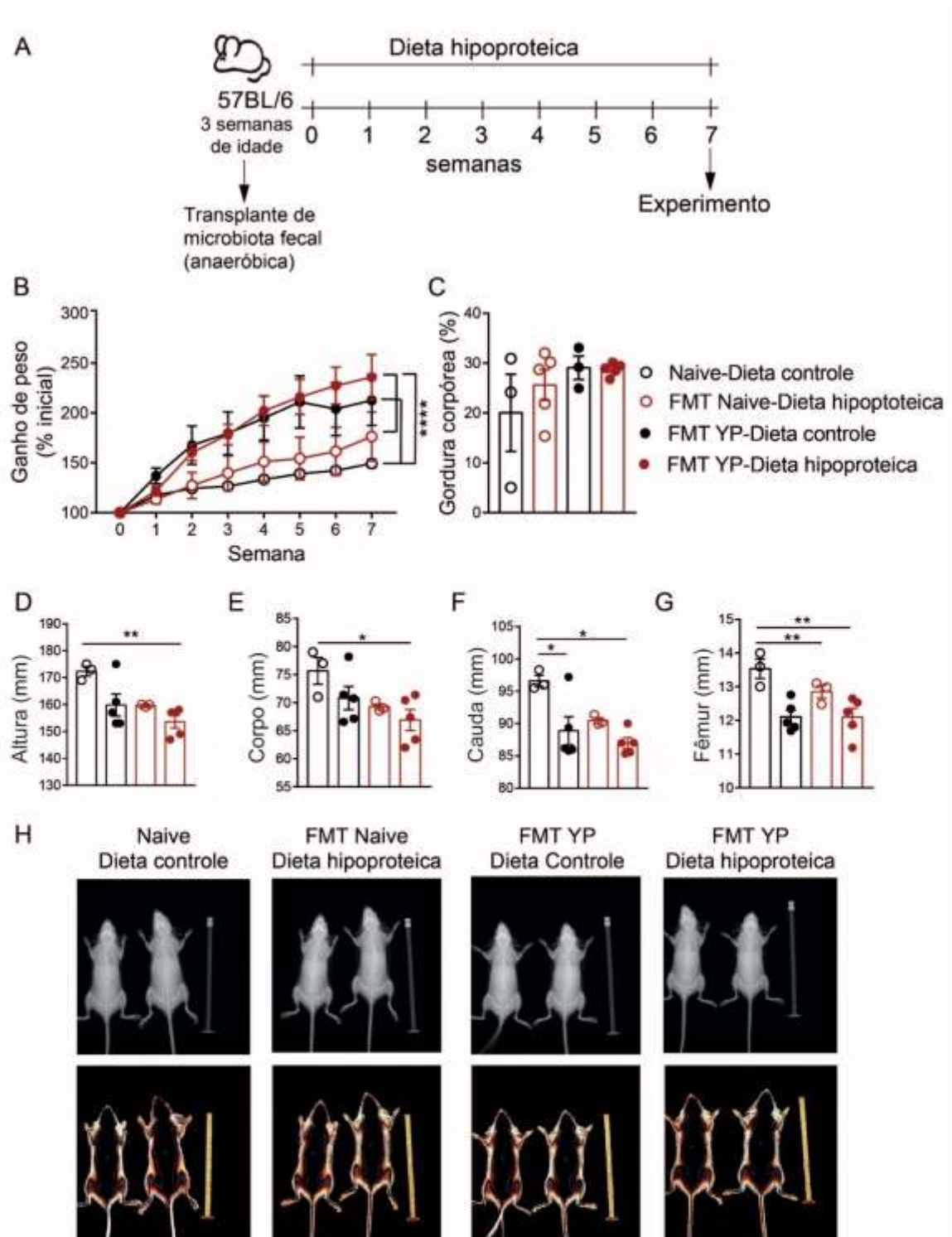


Figura 29: Avaliação do crescimento, desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal de animais que receberam transplante fecal de camundongos previamente infectados com *Y. pseudotuberculosis* e foram submetidos à dieta hipoproteica. Camundongos C57BL/6, desmamados com 3 semanas de idade receberam transplante de microbiota fecal de camundongos adultos naïves ou previamente infectados com a bactéria *Y.pseudotuberculosis*, e foram submetidos ao tratamento com dieta hipoproteica (A). Porcentagem de ganho de peso (B) ao decorrer de 7 semanas após o transplante fecal. Porcentagem de massa gorda (C), altura (D), tamanho do corpo (sem a cauda) (E), tamanho da cauda (F) e do fêmur (G). Imagem de raio X representativa da proporção de massa gorda e massa magra, obtida por meio da técnica de imageamento in vivo, (H). As imagens superiores

foram retiradas utilizando raio X com alta energia (filtro de 0.8mm), onde é possível observar as estruturas ósseas e a massa magra. Já as imagens inferiores representam a razão entre duas imagens adquiridas por meio da utilização de raio X com alta energia e de raio X total (sem filtro – 0.0), possibilitando a avaliação da gordura corpórea nos animais. Resultados representativos de um experimento, reproduzido uma vez, n= 3-5 animais por grupo. *P<0,05; **P< 0,01; **** P<0,0001.

4.11 Influência da dieta hipoproteica sobre a resposta específica para antígenos alimentares

Tendo em vista os resultados apresentados até o momento, hipotetizamos que os animais tratados com a dieta desbalanceada hipoproteica (mas também hipolipídica e baseada em carboidratos) respondem de maneira diferente aos antígenos que entram em contato com a mucosa intestinal, sejam eles de origem infecciosa (conforme descrito no item 4.5) ou de origem alimentar. Para testar tal hipótese utilizamos um sistema de transferência de células T naïves específicas para OVA, seguida de ingestão da proteína na água de beber dos animais em ambos os grupos experimentais: dieta controle ou dieta hipoproteica. Após uma semana de ingestão de OVA, rastreamos as células transferidas (que apresentavam marcador CD45.2 e foram transferidas para animais CD45.1) e caracterizamos a proliferação celular por meio da marcação prévia com *cell tracer* e o padrão de expressão de fatores de transcrição (**Figura 30A**)

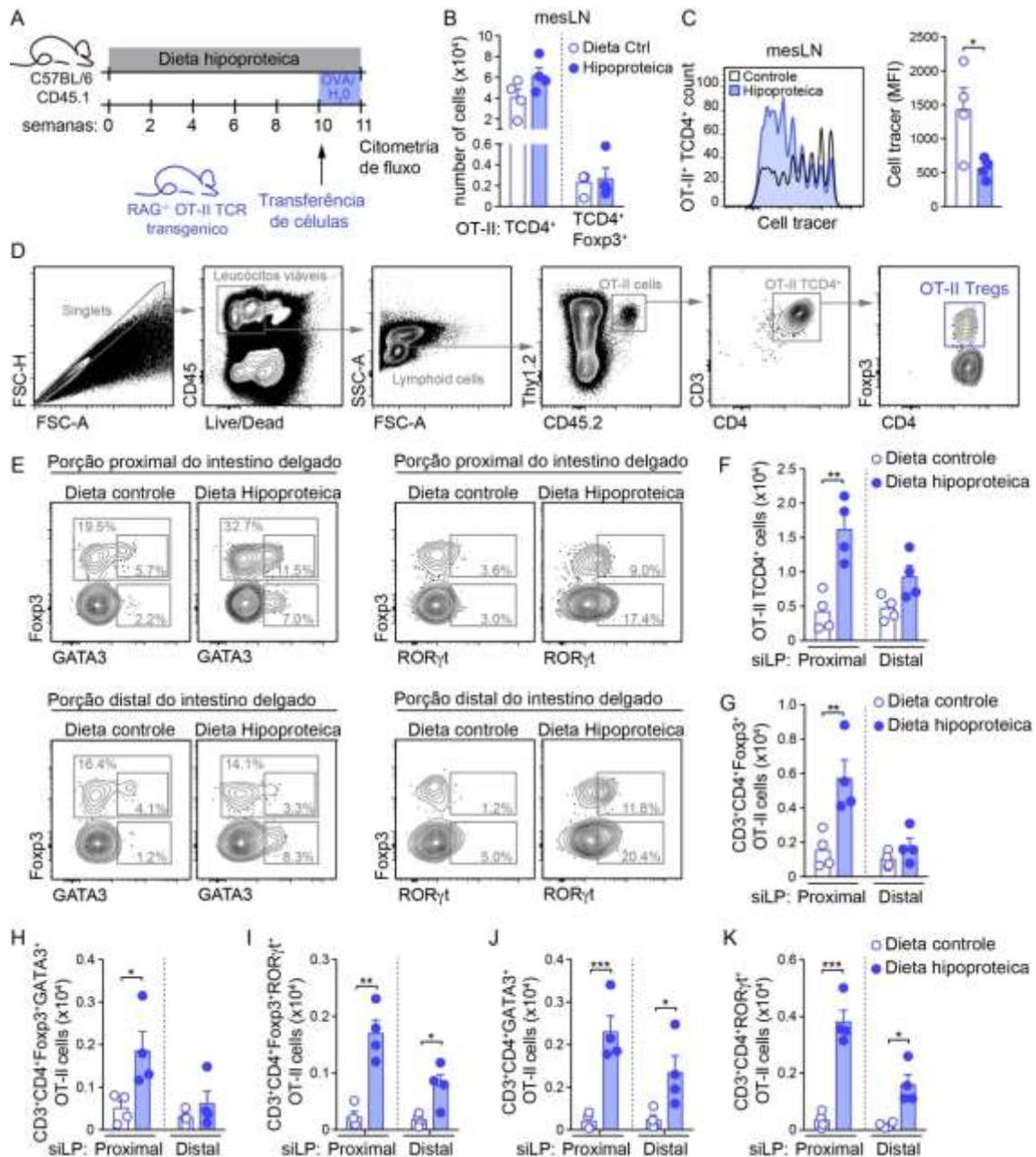


Figura 30: Avaliação da presença contra antígenos alimentares em animais tratados com dieta hipoproteica. Camundongos C57BL/6 CD45.1⁺ foram tratados com a dieta hipoproteica por 10 semanas. Após este período, células T com TCR específico para Ovalbumina (OVA) foram isoladas do baço e linfonodos de camundongos transgênicos RAG^{-/-}OTII CD45.2⁺, marcadas com marcador de proliferação *cell tracer violet* e transferidas para os camundongos C57BL/6 CD45.1⁺, tratados com dieta controle ou hipoproteica (A). Após a transferência celular, os animais foram alimentados com OVA 3% na água de beber por uma semana e, após este período as células transferidas foram rastreadas com base na expressão de CD45.2 e caracterizadas por citometria de fluxo (B-K). Número de células OTII TCD4⁺ e OTII Tregs (B), sobreposição dos histogramas e mediana da intensidade de fluorescência (MFI) relativos à marcação com *cell tracer* das células OTII recuperadas de animais controle ou tratados com a dieta hipoproteica (C). Estratégia de análise das células OTII recuperadas após transferência (D). Expressão dos diferentes fatores de transcrição nas células OTII recuperadas dos animais tratados com dieta controle ou hipoproteica (E-K). Resultados representativos de um experimento realizado duas vezes. n=4 animais por grupo experimental. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,005.

Quando avaliamos o número de células OTII TCD4⁺ e TCD4⁺Foxp3⁺ recuperadas dos linfonodos mesentéricos dos animais tratados com as diferentes dietas, não encontramos diferenças estatisticamente significativas (**Figura 30B**). Contudo, ao avaliar a marcação de *cell tracer* nestas células, constatamos que houve uma proliferação significativamente maior nas células OTII transferidas para animais alimentados com a dieta hipoproteica, em comparação à dieta controle (**Figura 30C**). Por isso, caracterizamos o padrão de expressão de fatores de transcrição das células OTII recuperadas das porções proximal e distal do intestino delgado dos animais (**Figuras 30D-K**). Células OTII, quando transferidas para animais do grupo controle, após ingestão de OVA na água de beber, se convertem, quase que exclusivamente em células Foxp3⁺ (**Figura 30E**). Por outro lado, constatamos que, em comparação aos animais tratados com a dieta controle, houve um aumento significativo das células OTII TCD4⁺, TCD4⁺Foxp3⁺, TCD4⁺Foxp3⁺ GATA3⁺, TCD4⁺Foxp3⁺ROR γ t⁺, TCD4⁺GATA3⁺ e TCD4⁺ ROR γ t⁺ recuperadas dos animais tratados com a dieta hipoproteica em ambas as porções do intestino delgado, porém de maneira significativamente mais expressiva na porção proximal (**Figuras 30D-K**). Não houve conversão para células TCD4⁺Tbet⁺ (dados não mostrados). Estes dados sugerem que células OTII se convertem para diferentes perfis de resposta Th2, Th17 e Treg, mas não em Th1, preferencialmente na porção proximal do intestino delgado dos animais tratados com a dieta hipoproteica.

Portanto, em conjunto, estes dados mostram que o microambiente tecidual no intestino delgado, após o tratamento com a dieta hipoproteica, favorece a ativação e diferenciação de células específicas para antígenos alimentares para diferentes perfis Th2 e Th17, além da resposta Treg canônica que deveria ser induzida neste tecido. Acreditamos que tal efeito também deva ocorrer mediante exposição a antígenos de origem infecciosa, como verificamos após a infecção por *Y. pseudotuberculosis*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em uma época onde o conhecimento e a tecnologia ligados às intervenções para melhoria da qualidade de vida estão largamente disponíveis, cerca de 15.000 crianças ainda morrem todos os dias, principalmente de causas evitáveis, como desnutrição e doenças infecciosas intestinais (UNIGME, 2018). Ambas são consideradas problemas de saúde pública que, apesar dos esforços das instituições de diversas instâncias, continuam distantes de uma solução definitiva. A desnutrição tem sido associada não apenas ao maior risco de mortalidade, mas também ao maior tempo de permanência hospitalar e ao aumento dos custos com internações (LEW et al, 2017). A EE está entre as causas da persistência a longo prazo dos efeitos deletérios de uma má nutrição no início da vida. Crianças com EE apresentam déficit de desenvolvimento e processos inflamatórios crônicos intestinais por anos, mesmo após a mudança para uma dieta balanceada e rica em nutrientes. Por isso, diversos grupos de pesquisa no mundo têm tentado entender o efeito do uso de dietas desbalanceadas sobre a homeostase imunológica intestinal.

Recentemente, foi demonstrado em modelo murino, que uma dieta pobre em proteínas foi capaz de diminuir significativamente o peso dos animais alimentados com a mesma. Essa redução foi associada com um aumento expressivo do FGF21 (fator de crescimento 21 dos fibroblastos, um regulador metabólico com múltiplos efeitos benéficos na homeostase da glicose e no metabolismo lipídico em modelos animais) no fígado e no sangue, que também está relacionado com níveis aumentados de proteína ATF4 (fator de ativação da transcrição 4), um mediador crítico da homeostase metabólica e oxidativa e da sobrevivência celular (PÉREZ-MARTÍ et al., 2017). Animais tratados com esta dieta, quando expostos a patobiontes, apresentaram o desenvolvimento de um processo inflamatório crônico intestinal que poderia explicar a patogênese de EE e de doenças inflamatórias intestinais em indivíduos, particularmente crianças expostas ao uso de dietas desbalanceadas.

Nossos dados mostraram que o uso da dieta hipoproteica foi capaz de diminuir a porcentagem de ganho de peso, quando comparamos com o grupo controle. Entretanto, este efeito foi mais pronunciado apenas na presença de infecção subclínica recorrente. Ainda não sabemos os mecanismos que levam

a este efeito. Fatores hormonais relacionados à saciedade podem estar relacionados, visto que esses animais apresentam alteração no consumo da dieta, ou ainda fatores de crescimento diretamente afetados pela diminuição dos níveis proteicos advindos da dieta, como demonstrado por Pérez-Martí e colaboradores (2017).

Esse mesmo fenótipo de redução do peso corporal foi demonstrado em dados publicados por Brown e colaboradores, onde o uso da dieta com baixa quantidade de proteína, foi capaz de causar um déficit significativo no ganho de peso dos animais, principalmente quando os animais eram colonizados com cepas invasivas de *Escherichia coli* (BROWN. E.M. et al, 2015). Dessa forma, assim como em nosso trabalho, apenas o uso da dieta hipoproteica não foi suficiente para causar prejuízos significativos no crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, sugerindo a necessidade de outro fator associado à mudança da dieta para o desenvolvimento de tal fenótipo.

Em nossos resultados, verificamos que esse fator pode ser infecções intestinais subclínicas e recorrentes, visto que quando associamos a infecção oral pela bactéria *Y. pseudotuberculosis*, a perda de peso foi exacerbada e acrescentada de redução do tamanho corporal, evidenciada pela diminuição de ossos importantes na mensuração do crescimento de camundongos. Também não sabemos quais os mecanismos envolvidos nesse processo, mas podemos afirmar que é necessária uma condição de baixa ingestão de proteínas previamente à infecção oral. Pois a dieta sozinha não é capaz de induzir esse fenótipo, e se tratamos animais previamente infectados com a dieta hipoproteica (baseada em carboidratos), estes apresentam melhora no crescimento e desenvolvimento. De fato, dados do nosso grupo mostraram que as alterações específicas da microbiota causadas pela infecção por *Y. pseudotuberculosis* confere aos camundongos uma vantagem no metabolismo de carboidratos, fazendo com que os mesmos ganhem mais peso, mesmo quando submetidos à dieta hipoproteica posteriormente à infecção (de SIQUEIRA, M.K. et al, em preparação para submissão).

A redução da quantidade de proteínas ofertada na dieta pode estar influenciando na transcrição de genes importantes no metabolismo, impedindo essa vantagem metabólica em animais que são submetidos ao mesmo tipo de infecção, porém em condições de dieta hipoproteica. Dessa forma, além da

perda de peso, os animais depois de infectados apresentaram um prejuízo significativo no desenvolvimento ósseo. Foi mostrado por Pérez-Martí e colaboradores (2017), que a dieta hipoproteica aumenta a expressão de ATF4, dependente de FGF21. O ATF4 é responsável por regular a diferenciação dos osteoclastos e, conseqüentemente, a reabsorção óssea através de sua expressão nos osteoblastos. O ATF4 se liga ao promotor do gene KappaB, que codifica um fator secretado pelos osteoblastos, promovendo a diferenciação dos osteoclastos (Ameri, K; Harris, A.L., 2010). Seriam necessários dados mais contundentes, como a avaliação do fator ATF4 nas nossas amostras, para sugerir a participação dessa via na diminuição do crescimento nos animais submetidos à dieta hipoproteica e posteriormente infectados com *Y. pseudotuberculosis*.

Outro fato curioso é que indivíduos submetidos à dieta desbalanceada, geralmente são acometidos por anemias ou alterações em outros grupos de células sanguíneas. O diagnóstico dessas alterações é feito por meio do hemograma. Nesse exame, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e o desvio padrão da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) são parâmetros que servem para avaliar as características das hemácias. Esses índices permitem verificar o tamanho e o formato dessas células, sendo usados em conjunto com a contagem das mesmas para diagnosticar diversos tipos de anemias (ENKIN, M.et al., 2005). Os animais tratados com a dieta hipoproteica não mostraram alterações significativas nesses parâmetros, sugerindo que a dieta sozinha não influencia na produção de células importantes na medula óssea. Dessa forma, não podemos considerá-la como uma dieta capaz de causar desnutrição, apenas como uma dieta desbalanceada.

Um estudo realizado por Menezes, J.S. (2003) e colaboradores, onde as proteínas intactas da dieta foram substituídas por quantidades equivalentes de aminoácidos, desde o desmame, investigou os efeitos da alteração na dieta no desenvolvimento do sistema imunológico de camundongos. Esses animais, na fase adulta, apresentam tecido linfóide associado ao intestino pouco desenvolvido, e número reduzido de células TCR $\alpha\beta$ e linfócitos intraepiteliais na lâmina própria intestinal. Além disso a produção de citocinas *in vitro* por células

de vários órgãos linfoides mostraram um perfil predominantemente Th2, com alta concentração de IL-10 e IL-4, e uma baixa concentração de IFN γ .

Esses parâmetros também se assemelham aos padrões imunológicos observados em camundongos recém desmamados, mostrando que a exposição a proteínas alimentares após o desmame tem um papel fisiológico na maturação do sistema imunológico local e sistêmico. Curiosamente, a região proximal do intestino delgado (duodeno e jejuno), mais envolvida na absorção de proteínas, foi mais afetada pelos efeitos da dieta (MENEZES, J.S., 2003). Em nosso trabalho, o uso de uma dieta deficiente em proteínas e também em lipídeos levou a resultados semelhantes, particularmente na porção proximal do intestino delgado, onde encontramos também uma maior frequência de DCs tolerogênicas, células Tregs e também uma maior capacidade de indução de Tregs em resposta a antígenos alimentares.

Também encontramos dados semelhantes em relação ao tamanho do intestino, visto que a dieta hipoproteica sozinha causou uma diminuição significativa no tamanho total do intestino. Por outro lado, a dieta aumentou significativamente o tamanho das vilosidades nas porções proximal e distal do intestino. Esse aumento pode estar relacionado com a tentativa de aumentar a absorção de nutrientes no local, já que a maior parte da dieta é constituída de carboidratos. É sabido que camundongos livres de microrganismos (*germ free*) possuem dificuldades na absorção de carboidratos, e que, aliado a isso, apresentam aumento expressivo do comprimento das vilosidades intestinais, reportado como mecanismo adaptativo para aumentar a capacidade de absorção dos carboidratos.

No entanto, um fenótipo contrário foi observado quando associamos a dieta hipoproteica com a infecção por *Y. pseudotuberculosis*. Notamos um achatamento e alargamento das vilosidades, principalmente na porção distal do intestino. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como infecções influenciam no estado nutricional, reduzindo a capacidade funcional do intestino. Estes incluem a redução da capacidade de absorção, o aumento da permeabilidade e a inflamação intestinal e sistêmica crônica, com alterações metabólicas que afetam a disponibilidade e utilização de nutrientes e micronutrientes (KOSEK, M.N., 2017).

Também notamos que a dieta causou alterações significativas de algumas populações celulares pertencentes a imunidade inata nas porções proximal e distal do intestino delgado, que vão de encontro com os dados mostrados por Menezes, J.S. (2003). Notamos um aumento significativo no perfil regulatório dos linfócitos em detrimento do perfil Th2, apenas no intestino proximal. Também notamos um aumento expressivo da coexpressão dos fatores de transcrição FOXP3 e GATA3. Essa alteração pode ter ocorrido como forma de compensar a diminuição significativa do perfil Th2 nas porções do intestino, com o intuito de aumentar a proteção local.

Destacamos ainda que as proporções celulares variaram de maneira oposta de acordo com o fragmento intestinal analisado. Ainda não sabemos se essas mudanças estão relacionadas a uma alteração do perfil celular em cada segmento, ou se a dieta influencia na migração dessas células de um segmento para outro, em razão da demanda decorrente de mudança dietética e conseqüentemente da microbiota local.

Sabemos que a polarização dos linfócitos é diretamente influenciada pelas células dendríticas (DCs) (ESTERHÁZI, D. et al, 2019). Essas células apresentadoras de antígenos geralmente são diferenciadas com base na expressão das moléculas de superfície CD103 e CD11b. Células dendríticas duplo positivas para estas moléculas geralmente estão relacionadas com a polarização de linfócitos T CD4⁺ para um perfil regulador e também para Th17 (ESTERHÁZI, D. et al, 2019).

O aumento dessa população celular no intestino dos animais que consumiram a dieta hipoproteica sugere que as células dendríticas podem estar induzindo um perfil regulador no intestino proximal (onde a taxa de absorção de alimentos é maior), com a finalidade aumentar a tolerância no local. Além disso, o aumento da produção da citocina IL-13 pelas ILCs, em um contexto de baixa absorção de proteínas, pode estar relacionado à uma tentativa de proteção da mucosa intestinal e manutenção da homeostase do intestino.

Também foi mostrado que as dietas hipoproteicas ou LPHC (do inglês *low protein high carbohydrate*) estão associadas com a redução do número de mitocôndrias (avaliados pela atividade da citrato sintase), aumento da formação de peróxido de hidrogênio, e expressão reduzida de PGC-1 α , principal regulador da biogênese mitocondrial (SOLON-BIET, S., 2014; HUANG, X., 2013). A

redução do número mitocondrial com dietas hipoproteicas é consistente com a inativação do mTOR (COUTEUR, D.G.L.,2015), um regulador central do crescimento celular, alvo mecanicista da rapamicina, pertencente ao grupo fosfatidilinosital 3, família de quinase relacionada à quinase (PI3KK). Existem dois complexos mTOR funcionalmente distintos, denominados mTORC1 e mTORC2, em todas as células eucarióticas. mTORC1 medeia os nutrientes e sinais responsáveis por controlar diversos processos celulares relacionados ao crescimento e proliferação celular, enquanto o mTORC2 é necessário para organização normal do citoesqueleto de actina (WEI Y., 2015). É possível que esses mecanismos estejam envolvidos na mudança de perfil das populações celulares alteradas na lâmina própria intestinal dos animais alimentados com a dieta hipoproteica. No entanto, seria necessário a realização de testes metabólicos para comprovar tal hipótese.

De acordo com Ning Ma e colaboradores (2017) a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal podem ser moduladas pelas proteínas da dieta que, por sua vez, afetam a saúde. A composição de aminoácidos, e a digestibilidade das proteínas, que são influenciadas por sua fonte e quantidade de ingestão, desempenham um efeito importante na composição da microbiota. Da mesma forma, a microbiota intestinal também é capaz de afetar o metabolismo das proteínas, o que indica que há uma relação bidirecional entre a microbiota e a proteína (LI, Z. et al, 2016). Em resposta às alterações nos componentes proteicos da dieta, existem mudanças significativas nos metabólitos microbianos, incluindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), amônia, aminas, gases como hidrogênio, sulfeto e metano, que são citotoxinas, genotoxinas e agentes associados ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (MA, N. et al, 2017). Estas mudanças da microbiota podem afetar a barreira intestinal e o sistema imunológico, regulando a expressão gênica de diversos fatores de transcrição importantes nas vias de sinalização relevantes, e a secreção de metabólitos.

É possível que tanto a dieta, quanto a infecção estejam modulando a microbiota local e influenciando na resposta imunológica do intestino. Um fato que pode sugerir essa influência, é que a análise das células imunológicas no intestino delgado total não revelou alterações acentuadas nos perfis das células imunológicas. No entanto, a avaliação das diferentes porções do intestino

mostrou alterações expressivas, principalmente na porção proximal, não apenas com o uso da dieta, mas também quando associamos a dieta com a infecção.

Além de sabermos que os nutrientes são absorvidos de formas distintas nas diferentes porções do intestino, as proteínas por exemplo são absorvidas na porção proximal, também é relatado na literatura que a microbiota intestinal está disposta de forma diferente em cada porção do intestino. Essa mudança também está relacionada com a disponibilidade de nutrientes e com o metabolismo destes (DOMINGUEZ-BELLO et al, 2011; MARTIN et al, 2010; LI, Z. et al, 2016). Como a microbiota e o sistema imunológico intestinal são mutuamente influenciados, e ambos são influenciados pela dieta, acreditamos que a dieta empregada em nosso trabalho possa estar modulando esses fatores, em conjunto, ou separadamente, sendo que as alterações imunológicas decorrentes da dieta podem estar afetando a microbiota em cada porção intestinal, ou o contrário.

Uma consequência desse processo foi verificada quando realizamos a infecção subclínica dos animais. Em camundongos alimentados com dieta controle, o inóculo subclínico da bactéria *Y. pseudotuberculosis* não é capaz de causar patologia (como inflamação intestinal ou perda de peso). No entanto, o mesmo inóculo em animais previamente tratados com a dieta desbalanceada (hipoproteica/hipolipídica) levou a uma significativa perda de peso e alteração na morfologia das vilosidades intestinais. É possível que as alterações da homeostase imunológica na mucosa intestinal para um perfil Treg/Th2 possa ter atrapalhado o controle inicial da infecção, causando uma inflamação exacerbada inicial e quebra da barreira intestinal, funcionando assim como um gatilho para um processo inflamatório crônico no intestino que culminou em defeitos na absorção de nutrientes. Contudo, em algum momento, os animais foram capazes de controlar a infecção, visto que ao final de 10 semanas após a infecção, não encontramos a presença de infecção ativa nos animais.

Essa inflamação crônica pode parecer incoerente com o aumento da capacidade destes animais em induzir a ativação de Tregs em resposta a antígenos orais. No entanto, o momento em que a Treg é ativada durante um processo infeccioso é fundamental para o desfecho da doença: números aumentados de Tregs no início da infecção podem atrasar a eliminação do

patógeno, enquanto seu surgimento ao final do processo infeccioso é fundamental para prevenir lesão tecidual e a inflamação crônica.

As interações entre infecções episódicas, recorrentes e crônicas e desnutrição proteica são complexas e bidirecionais. Por exemplo, crianças com alimentação pobre em proteínas parecem ter um risco substancialmente maior de diarreia, com maior incidência e maior gravidade relatadas em crianças desnutridas (WALSON, J.L.; BERKLEY, J.A., 2018). É possível que a chave para a compreensão de tais eventos esteja no efeito destas dietas desbalanceadas sobre a homeostase imunológica na mucosa intestinal. É importante agora, compreender os mecanismos envolvidos em tais fenômenos, assim como a duração destes efeitos.

Finalmente, acreditamos que há uma constante relação entre a diminuição da quantidade de proteínas ofertada na dieta, a disponibilidade desse nutriente nas diferentes porções do intestino e sua influência nas alterações de metabólitos locais, importantes para o desenvolvimento e manutenção do sistema imunológico local, bem como na microbiota residente. Por isso, entender os efeitos das dietas desbalanceadas a curto e longo prazo pode ser de relevância para compreensão do surgimento e prevalência de doenças intestinais crônicas, que são mediadas pelo sistema imunológico.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Concluimos, portanto que a mudança da dieta convencional (controle) para uma dieta baseada em carboidratos e pobre em lipídios e proteínas foi capaz de alterar a homeostase imunológica da barreira intestinal sem interferir de maneira significativa no desenvolvimento dos animais. Esta alteração estava associada a um microambiente com perfil Th2 e tolerogênico, que se mostrou prejudicial frente à exposição a infecções subclínicas recorrentes.

O uso da dieta hipoproteica associado com a infecção subclínica por *Y. pseudotuberculosis* parece reproduzir algumas características encontradas em uma doença denominada Enteropatia Ambiental, caracterizada por alterações na estrutura do epitélio intestinal, como diminuição e achatamento das vilosidades, aumento do infiltrado inflamatório no intestino e redução do crescimento dos animais. A associação da dieta com episódios de infecções orais pode servir de ferramenta para um modelo experimental da doença e como uma forma de tentar entender as consequências a longo prazo para populações submetidas restrições alimentares.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

AHERN, P.P.; MALOY, K.J. Understanding immune-microbiota interactions in the intestine. **Immunology**. V.159, n.1, p.:4-14. 2019. doi:10.1111/imm.13150.

AHMAD, R.; SORRELL, M.; BATRA, S. et al. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. **Mucosal Immunol**. v. 10, p.307–317.2017. Disponível: <https://doi.org/10.1038/mi.2016.128>.

Ameri, K; Harris, A.L. **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**. 2010.Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ATF4ID44413ch22q13.html>.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E. et al. Entero types of the human gut microbiome. **Nature**.v.473, p.174–180. 2011.

ATARASHI, K.; TANOUE, T.; HONDA, K. Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria. **Vaccine**. v.28, n.50, p. 8036-8038,2010.

BELKAID, Y.; BOULADOUX, N.; HAND, T. W. "Effector and memory T cell responses to commensal bacteria." **Trends Immunol**. v. 34, n.6, p. 299-306.2013.

BELKAID, Y.; HAND, T. W. "Role of the microbiota in immunity and inflammation." **Cell**. V. 157, n. 1, p.121-141. 2014.

BROWN, E.M.; WLODARSKA, M.; WILLING, B.P. et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nat Commun**. v.4, n.6, 2015. doi: 10.1038/ncomms8806.

CHARTOUMPEKIS, D.V.; HABEOS, I.G.; ZIROS, P.G.; PSYROGIANNIS, A.I. et al., Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. **Mol. Med**. v.17, n.7, p. 736–740. 2011.

CONG, Y.; FENG, T.; FUJIHASHI K. "A dominant, coordinated T regulatory cell IgA response to the intestinal microbiota." **Proc Natl Acad Sci USA**. v.106. n.46, p.19256-19261. 2009.

COUTEUR, D. G. L.; SOLON-BIET, S.; COGGER, V.C. et al. The impact of low-protein high-carbohydrate diets on aging and lifespan. **Cell Mol Life Sci**. v.73, n. 6, p. 1237–1252. 2015. doi: 10.1007/s00018-015-2120-y.

CRAVEN, M.; EGAN, C. E.; DOWD, S. E. et al. "Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's disease." **PLoS One**. v. 7, n. 7. 2012.

DE SIQUEIRA, M.K. et al. Acute infection imposes a long-term remodeling of host metabolism in a microbiota-dependent manner. **Em preparação para submissão (Cell Metabolism)**.

DILLON, A.; LO, D.D. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. **Front. Immunol.** v.10.Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01499>.

DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; BLASER, M.J.; LEY, R.E. et al. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. **Gastroenterology**.v.140, p.1713–1719.2011.

ENKIN, M.; KEIRSE, M.J.N.C.; NEILSON, J. et al. **Guia para atenção efetiva na gravidez e no parto**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ESTERHÁZI, D. et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. **Nature**. v.569, p. 126-130. 2019.

FONSECA, D. M. et al. Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity Article Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. **Cell**, v. 163, n. 2, p. 354–366, 2015.

Gonçalves, J.; Yaochite, J. et al. **Bases do Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal**. 2016.

GILMARTIN, A. A.; PETRI, W.A. JR. Exploring the role of environmental enteropathy in malnutrition, infant development and oral vaccine response. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v. 19; n. 370. 2015. doi: 10.1098/rstb.2014.0143. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527388/>

HAMMERSCHMIDT, S. I.; AHRENDT, M.; BODE, U. et al. "Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo." **J Exp Med**. v. 205, n.11, p. 2483-2490. 2008.

HAND, T. W.; DOS SANTOS, L. M.; BOULADOUX, N. et al. "Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses." **Science**. v.337, n.6101, p.1553-1556. 2012.

HAND, T. W.; VUJKOVIC-CVIJIN, I.; RIDAURA, V. K.; BELKAID, Y. "Linking the Microbiota, Chronic Disease, and the Immune System." **Trends Endocrinol Metab**. v.27, n. 12, p. 831-843. 2016.

HAND, T.W. The Role of the Microbiota in Shaping Infectious Immunity. **Trends Immunol**. v.37, n.10, p.647–658. 2016. doi:10.1016/j.it.2016.08.007.

HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A. et al. "Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*." **J Immunol**. v.177, n.12, p. 8785-8795. 2006.

HONDARES, E.; IGLESIAS, R.; GIRALT, A.; GONZALEZ, F. et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. **J. Biol. Chem.** v. 286, n. 15, p.12983–12990. 2011.

HOU, Y.C.; CHU, C. C.; KO, T.L. et al. Effects of alanyl-glutamine dipeptide on the expression of colon-inflammatory mediators during the recovery phase of colitis induced by dextran sulfate sodium. **Eur J Nutr.** v.52, p.1089–1098. 2013. doi:10.1007/s00394-012-0416-3

HUANG, X.; HANCOCK, D.P.; GOSBY, A.K. et al. Effects of dietary protein to carbohydrate balance on energy intake, fat storage, and heat production in mice. **Obesity** v.21, p.85–92. 2013.

IJICHI, S.; KUSAKA, T.; OKADA, H.; FUJISAWA, T.; KOBARA, H.; ITOH, S. "Terminal ileitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* mimicking Crohn disease in childhood." **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** v.55, n.4, p.125. 2012.

IVANOV, I.I.; ATARASHI, K.; MANEL, N. "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria." **Cell.** v.139, n. 3, p. 485-498. 2009.

JOERIS, T.; MULLER-LUDA, K.; AGACE, W.W.; MOWAT, A.M. Diversity and functional of intestinal mononuclear phagocytes. **Mucosal Immunol.** V.10, n.4, p.845-864, 2017.

KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. "Inflammatory bowel disease." **Annu Rev Immunol** v.28, p. 573-621. 2010.

KELLY, P.; BESA, E.; ZYAMBO, K. et al. Endomicroscopic and Transcriptomic Analysis of Impaired Barrier Function and Malabsorption in Environmental Enteropathy. **PLoS Negl. Trop. Dis.**v.10,n.4. 2016. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050312>.

KIM, C.J.; KOVACS-NOLAN, J.A.; YANG, C. et al. Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. **J Nutr Biochem.** v.21, p.468–75. 2009. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.01.019

KORPE, P.S.; PETRI, W.A. Environmental enteropathy: critical implications of a poorly understood condition. **Trends Mol Med.** v.18, n.6, p.328-36.2012. doi: 10.1016/j.molmed.2012.04.007.

KORPE, P. S.; STOTT, B. R.; NAZIB, F. et al. "Evaluation of a rapid point-of-care fecal antigen detection test for *Entamoeba histolytica*." **Am J Trop Med Hyg.** v.86, n.6, p. 980- 981. 2012.

KOSEK, M.N. et al. Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. **EBioMedicine.**v.18. p. 109–11. 2017.

LAMPS, L. W.; MADHUSUDHAN, K. T.; HAVENS, J. M. et al. "Pathogenic Yersinia DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease." **Am J Surg Pathol**. v.27, n. 2, p. 220-227. 2003.

LEW, C.C.H.; YANDELL, R.; FRASER, R.J. et al. Association between malnutrition and clinical outcomes in the intensive care unit: A systematic review. **J. Parenter. Enter. Nutr.** v.41, p. 744-758. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1177/0148607115625638#accessDenialLayout>.

LINDEN, S.; SUTTON, P.; KARLSSON, N. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunol**. p.183–197.2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mi.2008.5>.

LI, Y.; JIN, L.; CHEN, T. The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. **Biomed Res Int**. 2020. doi:10.1155/2020/2032057

LI, Z.; RAVA, M.; BEDARD, A. et al. Cured meat intake is associated with worsening asthma symptoms. **Thorax**. v. 72, p.206–212. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208375. 2016.

LUPP, C.; ROBERTSON, M. L.; WICKHAM, M. E. et al. "Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae." *Cell Host Microbe*. v. 2, n. 3, p. 204. 2007.

MA, N.; YANAN, T.; YI, W.; XI, M. Contributions of the Interaction between Dietary Protein and Gut Microbiota to Intestinal Health. **Curr Protein Pept Sci**. 2017. doi: 10.2174/1389203718666170216153505.

MACPHERSON, A. J.; SLACK, E.; GEUKING, M. B.; MCCOY, K. D. "The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes." **Semin Immunopathol**. v.31, n.2, p.145-149. 2009.

MACPHERSON, A. J.; UHR. T. "Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria." **Ann N Y Acad Sci**. v.1029, p.36-43. 2004.

MACPHERSON, A. J.; UHR. T. "Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria." **Science**. v. 303, n. 5664, p.1662-1665. 2004.

MARCHIANDO, A. M.; GRAHAM, W. V.; TURNER, J. R. "Epithelial barriers in homeostasis and disease." **Annu Rev Pathol**. v. 5, p. 119-144. 2010.

MARCHIANDO, A. M.; SHEN, L.; GRAHAM, W. V. et al. "Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo." **J Cell Biol**. v.189, n. 1, p.111-126. 2010.

MARTIN, R.; NAUTA, A.J.; BEN, A. K. et al. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. **Benef Microbes**. v.1, p.367–382. 2010.

MENEZES, J.S.; MUCIDA, D.S.; CARA, D.C. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **Int Immunol**. v.15, n. 3, p.447-455. 2003. doi:10.1093/intimm/dxg043.

MOLLOY, M. J.; GRAINGER, J. R.; BOULADOUX, N. et al. "Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis." **Cell Host Microbe**. v.14, n.3, p.318-328. 2013.

MONDAL, D.; MINAK, J.; ALAM, M. "Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh." **Clin Infect Dis**. v.54, n. 2, p.185-192. 2012.

MUCIDA, D.S.; RODRÍGUEZ, D.; KELLER, A.C. et. al. Decreased nasal tolerance to allergic asthma in mice fed an amino acid-based protein-free diet. **Ann N Y Acad Sci**.v.1029, p.361-365. 2004. doi:10.1196/annals.1309.042.

OWEN, J.L.; MOHAMADZADEH, M. Microbial activation of gut dendritic cells and the control of mucosal immunity. **J Interferon Cytokine Res**. V.33, n.11, p.619-631, 2013.

PÉREZ-MARTÍ, A.; GARCIA-GUASCH, M.; TRESSERRA-RIMBAU, A. et al. A low-protein diet induces body weight loss and browning of subcutaneous white adipose tissue through enhanced expression of hepatic Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21). **Mol Nutr Food Res**. 2017 doi: 10.1002/mnfr.201600725.

PERXACHS, J.M.; BOLICK, D.T.; LENG, J. et al. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. **Am J Clin Nutr**. v. 104, n. 5, p.1253-1262. 2016. doi:10.3945/ajcn.116.131797

PETRI, W.A. JR.; NAYLOR, C.; HAQUE, R. Environmental enteropathy and malnutrition: do we know enough to intervene? **BMC Med**. v.12, n.187. 2014 doi: 10.1186/s12916-014-0187-
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4197320/>.

PRENDERGAST, A.J.; KELLY, P. Interactions between intestinal pathogens, enteropathy and malnutrition in developing countries. **Curr Opin Infect Dis**. v.29, n.3, p.229-236. 2016. doi:10.1097/QCO.0000000000000261.

RAPOZO, D. C.; BERNARDAZZI, C.; DE SOUZA, H. S. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. **World journal of gastroenterology**, n. 23, v.12, p.2124–2140. 2017. doi:10.3748/wjg.v23.i12.2124.

RESCIGNO, M. Intestinal dendritic cells. **Adv Immunol**. v.107, p. 109-138, 2013.

RIDAURA, V. K. et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. **Science**. v. 341, n. 6150.2013.

SANSONETTI, P. J. War and peace at mucosal surfaces. **Nat Rev Immunol**. v. 4, n. 12, p. 953–964. 2004. doi: 10.1038/nri1499.

SCHENK, M.; MUELLER, C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. Best Practice & research. **Clinical Gastroenterology**.v.22, n. 3, p. 391-409. 2008. doi: 10.1016/j.bpg.2007.11.002.

SOLON-BIET, S.; MCMAHON, A.; BALLARD, J.W.O. et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging and longevity in ad libitum-fed mice. **Cell Metab**. v.19, p.418–430. 2014.

STATOVCI, D.; AGUILERA, M.; MACSHARRY, J.; MELGAR, S. The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. **Front. Immunol**. v. 8, n. 838. 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00838

SUBRAMANIAN, S.; HUQ, S.; YATSUNENKO, T., et al. Persistent Gut Microbiota Immaturity in Malnourished Bangladeshi Children. **Nature**. v.510; p. 417-421. 2014.

SWARBRICK, E. T.; KINGHAM, J. G.; PRICE, H. L. et al. "Chlamydia, cytomegalovirus, and Yersinia in inflammatory bowel disease." **Lancet**. v. 2, n. 8132, p.11-12. 1979.

TURNER, J. R. "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." **Nat Rev Immunol**. v. 9, n.11, p.799-809. 2009.

UEMATSU, S. et al. Regulation and humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. **Nat Immunol**. v.9, n.7, p. 769-776,2008.

UNIGME -United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. 'Levels & Trends in Child Mortality: Report 2018, Estimates developed by the United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation', United Nations Children's Fund, New York, 2018. Disponível em: <https://childmortality.org/wp-content/uploads/2018/12/UN-IGME-Child-Mortality-Report-2018.pdf>.

VAROL, C. et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. **Immunity**. v.31, n.3, p.502-512, 2009.

WAGNER, V.E.; DEY, N.; GURUGE, J. et al. Effects of a gut pathobiont in a gnotobiotic mouse model of childhood undernutrition. **Sci Transl Med**. v.23, n.8. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5152673/>.

WALSON, J.L.; BERKLEY, J.A. The impact of malnutrition on childhood infections. **Curropin Infect Dis**. v. 31, n. 3. p. 231–236.2018. doi: 10.1097/QCO.0000000000000448.

WEI, Y.; ZHANG, Y.J.; CAI, Y.; XU, M.H. The role of mitochondria in mTOR-regulated longevity. **Biol Rev Camb Philos Soc.** v.90, p.167–181. 2015.

WEN, L.; WONG, F. S. Dietary short-chain fatty acids protect against type 1 diabetes. **Nature Immunology.** v. 18, n. 5, p. 484–486. 2017.

Zhu, B.; Wang, X.; Li, L. Human gut microbiome: the second genome of human body. **Protein Cell.**v.1, p.718–725. 2010.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4875195/>

ZIPPI, M.; COLAIACOMO, M. C.; MARCHEGGIANO, A. et al. "Mesenteric adenitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in a patient subsequently diagnosed with Crohn's disease of the terminal ileum." **World J Gastroenterol.** v.12, n.24, p.3933-3935. 2006.

ANOTAÇÕES: