

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

BÁRBARA CRISTINA PIZZOLANTE

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA DO TECIDO ADIPOSEO
PÓS-INFECÇÃO INTESTINAL AGUDA: CONTRIBUIÇÃO DA RESPOSTA TH2 E DE
ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA

SÃO PAULO

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

BÁRBARA CRISTINA PIZZOLANTE

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA DO TECIDO ADIPOSEO
PÓS-INFECÇÃO INTESTINAL AGUDA: CONTRIBUIÇÃO DA RESPOSTA TH2 E DE
ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA

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

2021

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)

Pizzolante, Bárbara Cristina

Mecanismos envolvidos na inflamação crônica do tecido adiposo pós-infecção intestinal aguda: contribuição da resposta Th2 e de ácidos graxos de cadeia curta / Bárbara Cristina Pizzolante; orientadora Denise Moraes da Fonseca. -- São Paulo, 2021.

105 p.

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

1. Infecção intestinal. 2. Inflamação . 3. Tecido adiposo. 4. Aterosclerose. I. Moraes da Fonseca, Denise , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Bárbara Cristina Pizzolante

Título da Dissertação: Mecanismos envolvidos na inflamação crônica do tecido adiposo pós-infecção intestinal aguda: contribuição da resposta Th2 e de ácidos graxos de cadeia curta

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ___/___/___, considerou a candidata:

Aprovada

Reprovada

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

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

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

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Ricardo Wesley Alberca Custódio (Pós-graduando), 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)*

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

CERTIFICATE

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

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

- Team members: *Ricardo Wesley Alberca Custódio (Graduate Student), 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>	C57BL/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 Sales 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.20.2018

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) **Bárbara Cristina Pizzolante** na equipe do 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, 20 de fevereiro de 2019.

Luciane Valéria Sita

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

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais, Fia e Pedro, ao meu amor Adolpho e a todos que me ajudaram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu **Deus**, e a **Nossa senhora** por toda força, proteção e acalento nos momentos de oração. Obrigada por mais essa conquista.

Aos meus amados pais, **Fia e Pedro**, sem o apoio de vocês, eu jamais teria chegado até aqui. Obrigada por todo amor, carinho e paciência que sempre tiveram comigo, por todas as vezes que se preocuparam com a minha saúde física e principalmente mental durante essa etapa, minha vida e todas as minhas conquistas eu devo a vocês. Aos meus maninhos, **Hugo e Jefferson**, por todo companheirismo e por sempre me lembrarem que a vida merece ser vivida.

À minha prima **Juliana**, por toda irmandade, amizade, orações e por dividir comigo mais esse momento; Aos meus tios **Nalva e Luís** por todos os conselhos e por sempre se fazerem presentes em minha vida, mesmo com toda correria do dia a dia, e as minhas avós **Nair e Maria**, por toda oração e conselhos.

Ao meu amor, **Adolpho**, por todo companheirismo, amizade, paciência e por sempre me apoiar e me encorajar na busca por meus sonhos. Que prazer poder partilhar desta vida com você.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Denise Moraes da Fonseca**, pela confiança e oportunidade em fazer parte do seu laboratório, por todo ensinamento em cada experimento e por todas as vezes que sempre foi solícita e disponível para tirar minhas dúvidas e as dos meus colegas. Obrigada por me ajudar a crescer profissionalmente.

Aos meus queridos amigos e parceiros do Laboratório de Imunologia de Mucosas-LabIM, por todo auxílio, apoio, e ensinamento diários. Às antigas companheiras, **Mirian e Marcela** por compartilharem suas experiências científicas e por serem referência do quanto podemos ser bons e capazes quando realizamos nossas tarefas com amor e dedicação.

Às minhas queridas e grandes amigas **Jaqueline e Marina**, por toda ajuda, por me ouvirem e tornarem os meus dias muito mais felizes e intensos, obrigada por todos os momentos que passamos na bancada e principalmente, fora dela, e pela linda amizade que construímos, vocês são exemplos de resiliência e empatia e eu sou imensamente grata a Deus por ter cruzado nossas vidas; À mestre **Luísa**, pela trajetória de amizade e ensinamentos que teve início antes do LabIM, e que permanecerá além do ICB, você é um exemplo de dedicação a todos que te conhecem; e ao nosso querido e surtado **Caio**, aquele que chegou querendo fazer tudo sozinho,

mas que aos pouquinhos aprendeu que somos um time, e que sempre poderá contar com os amigos de bancada, tanto para os assuntos científicos como para qualquer outro que estivermos afim de conversar, muito obrigada por toda ajuda e por sua amizade.

Agradeço também a todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo LabIM, em especial a **Maria** e ao **Bernardo**, alunos dedicados e solícitos, que suas jornadas sejam brilhantes.

Aos meus amigos e colegas do ICB que tive o prazer de conhecer, aprender, que me auxiliaram a crescer cientificamente e a descobrir que passamos juntos pelos desafios da pós graduação, em especial ao **Victor**, nosso doutorando emprestado da UFRJ, muito obrigada por todos os almoços em baixo da árvore, por compartilhar de suas experiências e por sempre me ouvir e ter uma palavra animadora a dizer; um agradecimento especial também para as amigas e vizinhas de lab, à **Josi**, à **Carol** e à **Bruninha**.

Agradeço também a todos os professores e funcionários do departamento de Imunologia, que sempre me trataram com tanta gentileza, educação e que sempre me mostraram que há muito o que aprender com cada um, em especial ao **Prof. Anderson**, **Prof. Niels** e a **Profa. Lepique**; aos meus colegas da portaria, em especial ao **Sr. Antônio**, ao **Sr. Damata** e **Sr. Otacilio**, da limpeza, especialmente à **Neidinha**, da manutenção, da secretária, da sala de lavagem, do CEFAP e do biotério, especialmente o **Luciano**. Sem vocês, nosso trabalho nessa instituição seria impossível.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Alves Filho** (FMRP/USP) por ter concedido parte da linhagem de animais que utilizei para os meus experimentos e por contribuído tanto com seu conhecimento para o direcionamento deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer ao departamento de Imunologia e Parasitologia da UFTM, às pessoas que foram essenciais para o início da minha jornada científica, no qual pude aprender, me apoiar e me sentir honrada em fazer parte do time, que assim como excelentes profissionais, davam aula em como ser excelentes pessoas, por isso minha imensa gratidão ao **Prof. Dr. Marcos Vinicius** (Marquinhos), ao **Prof. Dr. Helioswilton Sales** (Ton), **Prof. Dr. Carlo Oliveira** (Mestrão) e a todos os amigos de bancada que tanto me ajudaram durante minha iniciação científica, durante a realização do meu Trabalho de Conclusão de Curso e para o início da minha jornada na pós-graduação, muito obrigada **Lu, Mari, Carol, Paulinha, Rafa, Malu, Chan, Jon e Wesley**.

Por fim, agradeço imensamente às agências de fomento que contribuíram financeiramente para o desenvolvimento deste trabalho, **FAPESP** (Projetos 2015/25364-0; 2019/14026-8), **CAPES** (PROEX) (Processo 327964/2019-01) e **CNPq**.

Este trabalho foi realizado sob orientação da Prof. Dr.^a Denise Moraes da Fonseca, desenvolvido no Laboratório de Imunologia de Mucosas – LabIM, no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, do Conselho de Apoio à Pesquisa no Ensino Superior - CAPES (PROEX) (Processo 327964/2019-01), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 2015/25364-0 e 2019/14026-8).

RESUMO

PIZZOLANTE, B.C. **Mecanismos envolvidos na inflamação crônica do tecido adiposo pós-infecção intestinal aguda: contribuição da resposta Th2 e de ácidos graxos de cadeia curta.** 2021. 105f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Nos últimos anos, tem sido evidenciado uma importante conexão entre sistema imunológico e microrganismos intestinais no desenvolvimento de obesidade, síndromes metabólicas e doenças cardiovasculares. Recentemente mostramos que um único episódio de infecção intestinal por *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) é capaz de induzir um fenômeno conhecido como “cicatriz imunológica”, que inclui, inflamação crônica do tecido adiposo mesentérico (MAT, do inglês *Mesenteric Adipose Tissue*) e linfonodo mesentérico, lesão permanente dos vasos linfáticos mesentéricos, associado a um comprometimento no tráfego e na capacidade de absorver e utilizar lipídeos como fonte de energia, e a uma melhora na sensibilidade a insulina, denominado assim como, síndrome metabólica não clássica. O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos na manutenção da cicatriz imunológica e nas alterações metabólicas induzidas pós-infecção por YP. Para tal, inicialmente testamos se a microbiota intestinal poderia estar associada a este tipo de alteração metabólica. Verificamos que esta associação existe, mas que parece não estar relacionada a maior produção de ácidos graxos de cadeia curta pela microbiota intestinal pós-infecção por YP. Dessa forma, avaliamos o impacto do remodelamento do MAT e linfonodo mesentérico (mesentério) decorrente da infecção por YP sobre o desenvolvimento da síndrome metabólica não clássica. Para tanto, buscamos estratégias diferentes para tentar reverter a inflamação no mesentério e assim observarmos a interferência na resposta à insulina. Para tal, utilizamos do tratamento com glibenclamida (por sua capacidade de inibir o inflamassoma NLRP3), e duas estratégias para restaurar a homeostase imunológica no mesentério pela indução de células do perfil do tipo 2 através da imunização com ovalbumina (OVA) e o adjuvante alum. Entretanto, nenhuma das estratégias que utilizamos foi capaz de reverter a inflamação no mesentério, bem como retornar satisfatoriamente a resposta imune canônica no MAT. Além disso, observamos a influência do aumento de linfócitos B no MAT pós-infecção por YP na resposta à insulina, a partir do uso de camundongos deficientes para células B maduras. A ausência destas células aumentou a resistência à insulina e eliminou o aumento de sensibilidade à insulina induzido pela infecção por YP, sugerindo que o recrutamento de linfócitos B pós-infecção pode estar envolvido na melhora metabólica induzida por YP. Por fim, avaliamos funcionalmente a alteração no tráfego lipídico pós-infecção por YP, utilizando o modelo de desenvolvimento de aterosclerose, a partir da alimentação de camundongos deficientes para ApoE com uma dieta hipercolesterolêmica (HCD). Observamos que a infecção prévia por YP aumentou significativamente a susceptibilidade ao desenvolvimento de aterosclerose. Dessa forma, nossos dados sugerem que a infecção gastrointestinal aguda por YP pode estar associada a novas consequências a longo prazo, tanto para a resistência a polarização de resposta imune do tipo 2 no tecido adiposo, como para a predisposição ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Acreditamos que linfócitos B podem ter uma participação importante neste processo.

Palavras chave: Infecção intestinal. Inflamação. Tecido adiposo. Aterosclerose.

ABSTRACT

PIZZOLANTE, B. C. **Mechanisms involved in chronic inflammation of adipose tissue after acute intestinal infection: contribution of the Th2 response and short-chain fatty acids.** 2021. 105f. Master thesis (Immunology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

In the recent years, it has been evidenced an important connection between the immune system and intestinal microorganisms in the development of obesity, metabolic syndromes and cardiovascular diseases. We have shown that a single episode of intestinal infection by *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) is capable of inducing a phenomenon known as "immunological scarring", which includes chronic inflammation of the mesenteric adipose tissue (MAT) and mesenteric lymph node (mesentery), a permanent damage of mesenteric lymph vessels, associated with changes in lipid traffic and a limited capacity for using lipids as an energy source despite the presence of improved glucose disposal due to an improvement on insulin sensitivity. We named this process as a non-classical metabolic syndrome. In this study, we investigated the mechanisms sustaining the "immunological scar", as well as the metabolic changes induced by YP infection. Initially, we tested whether changes in the gut microbiota could be associated with the metabolic alterations by YP. We verified that this association exists, but that it does not seem to be related to a higher production of short-chain fatty acids by the intestinal microbiota after YP infection. Thus, we evaluated the impact of the MAT and mesenteric lymph node remodeling resulting from YP infection on the development of the non-classical metabolic syndrome. Therefore, we searched for different strategies to reverse the mesenteric inflammation and its interference in the insulin response. For this purpose, we tested the treatment with glibenclamide (which blocks NLRP3), in order to reduce the inflammation in the mesentery, and two strategies to restore the homeostatic type 2 immunity in the MAT by the immunization with ovalbumin (OVA) plus alum adjuvant. However, none of these strategies was able to reverse inflammation in the mesentery, as well as to satisfactorily return the canonical immune response in the MAT, even though it proved to be satisfactory for the return of an insulin response closer to homeostatic levels. Furthermore, we evaluated the contribution of the B lymphocytes in the MAT induced by YP infection on the insulin response, by using mice deficient for mature B cells (B-KO). We found that the absence of mature B cells completely abrogated the increased insulin sensitivity induced by YP infection. Finally, we evaluated the functional impact of the changes in lipid traffic induced by YP infection, using an experimental model of atherosclerosis by feeding of ApoE deficient mice with a hypercholesterolemic diet (HCD). We observed that the previous infection with YP increased the susceptibility to the development of atherosclerosis. Thus, our data suggest that other long-term effects of YP infection may include the impairment of induction of type 2 immunity, locally and systemically, and increased susceptibility to the development of cardiovascular diseases, including atherosclerosis. Also, B cells seems to play a role in the metabolic changes induced by YP infection.

Keywords: Intestinal infection. Inflammation. Adipose tissue. Atherosclerosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACK – Amonio, Cloreto e Potássio (do inglês, *Ammonium-Chloride-Potassium*)
- Apo – Apolipoproteínas
- ApoE-KO – Nocaute para a apolipoproteína E (do inglês, *Knockout*)
- ATP – Adenosina trifosfato (do inglês, *Adenosine Triphosphate*)
- BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)
- CD – Cluster de Diferenciação
- CEFAP – Centro de Facilidades e Apoio à Pesquisa
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação
- DCs – Células Dendríticas (do inglês, *Dendritic Cells*)
- FFAs – Ácidos Graxos livres (do inglês, *Free Fatty Acids*)
- FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- GIP – Peptídeo Inibidor Gástrico (do inglês, *Gastric Inhibitor Peptide*)
- GF – Livres de microrganismos (do inglês, *Germ Free*)
- GLUT – Transportador de glicose (do inglês, *Glucose Transporter*)
- GPCRs – Receptor acoplado a proteína G (do inglês, *G-Protein Coupled Receptor*)
- GTT – Teste de tolerância a glicose (do inglês, *Glicose Tolerance Test*)
- HBSS – do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*
- HCD – Dieta Hipercolesterolêmica (do inglês, *Hipercolesterolemic Diet*)
- HDL – Lipoproteína de alta densidade (do inglês, *High Density Lipoprotein*)
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)
- ICB – Instituto de Ciência Biomédicas
- IDL - Lipoproteína de densidade intermediária (do inglês, *Intermediated Density Lipoprotein*)
- Ig – Imunoglobulina
- IKK – Inibidor da quinase K (do inglês, *Inhibitor of κ Kinase*)
- IL – Interleucina

ILC - Célula linfoide inata (do inglês, *Innate Lymphoid Cells*)

IP – Intraperitoneal

ITT – Teste de tolerância a insulina (do inglês, *Insulin Tolerance Test*)

JNK – C-jun N-terminal (do inglês, *C-jun N-terminal Kinase*)

LabIM – Laboratório de Imunologia de Mucosas

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low Density Lipoprotein*)

LDLr – Receptor da LDL (do inglês, *LDL receptor*)

LPS – Lipopolissacarídeos

mL – Mililitros

M μ KO – Nocaute para IgM (do inglês, *Knockout*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OVA – Ovalbumina

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*)

pAT – Tecido adiposo pericárdico (do inglês *Pericardial Adipose Tissue*)

pH – Potencial hidrogeniônico

PKR – Proteína quinase R (do inglês, *Protein Kinase R*)

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*)

SCFAs – Ácidos graxos de cadeia curta (do inglês, *Short Chain Fatty Acids*)

SFB – Soro fetal bovino

SGLT1 – Cotransportador de glicose dependente de sódio 1 (do inglês, *Sodium-Dependent Glucose Cotransporters 1*)

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*)

Th – T auxiliar (do inglês, *T helper*)

TLR4 – Receptor do tipo toll 4 (do inglês, *Toll Like Receptor 4*)

TMA – Trimetilamina (do inglês *Trimethylamine*)

TMAO – N-óxido de trimetilamina (do inglês *Trimethylamine N-oxide*)

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Fator*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Fator Alfa*)

Treg – T reguladora

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

VCs – Válvulas cardíacas

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa (do inglês *Very Low Density Lipoprotein*)

YP – *Yersinia pseudotuberculosis*

μL – Microlitros

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
1.1 – A barreira intestinal e suas funções.....	19
1.2 – A microbiota e as infecções intestinais	22
1.3 – A microbiota intestinal e a relação ao desenvolvimento de doenças inflamatórias ..	23
1.4 – O metabolismo de carboidratos e lipídeos	27
1.5 – A microbiota e as infecções intestinais e sua relação com a aterosclerose	29
2. Objetivos	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3. Materiais e Métodos	34
3.1 Camundongos	34
3.2 Infecção Oral.....	34
3.3 Testes metabólicos.....	35
3.4 Transplante de microbiota fecal.....	36
3.5 Dosagem dos SCFAs	36
3.6 Dieta Especial	36
3.7 Delineamento experimental para indução de lesões ateroscleróticas	37
3.8 Análise histopatológica.....	38
3.9 Coleta do coração e aorta para histologia	38
3.10 Preparação dos cortes histológicos do coração.....	38
3.11 Coloração dos corações com <i>oil red</i>	39
3.12 Coloração das aortas com <i>oil red</i>	39
3.13 Análise da área da placa aterosclerótica	40
3.14 Delineamento experimental para o tratamento com glibenclamida.....	40
3.15 Delineamento experimental para indução de uma resposta imunológica do tipo 2 no MAT.....	41
3.16 Delineamento experimental para indução de uma resposta imunológica do tipo 2 em modelo de desenvolvimento de aterosclerose	42
3.17 ELISA	43

3.18 Gavagem com <i>bodipy</i>	43
3.19 Processamento tecidual e extração celular.....	44
3.20 Análise das populações celulares por citometria de fluxo	45
3.21 Análise por tSNE – <i>t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding</i>	50
3.22 Análise Estatística.....	51
4. Conclusões	52
5. Referências bibliográficas	53

1. Introdução

1.1 – A barreira intestinal e suas funções

O maior compartimento de células imunológicas do corpo encontra-se distribuído ao longo da mucosa intestinal. Este tecido está constantemente exposto a uma ampla variedade de antígenos e agentes imunomoduladores provenientes, principalmente da dieta e da microbiota comensal. Ao longo dos últimos anos, é crescente o interesse pelo estudo de como o conteúdo intestinal, como os constituintes da dieta e da microbiota comensal, podem influenciar os processos fisiológicos e patológicos de todo o corpo (MOWAT e AGACE, 2014).

As diferentes porções do intestino apresentam funções fisiológicas distintas, principalmente devido a diferenças em sua estrutura e constituintes celulares. O intestino delgado, dividido em duodeno, jejuno e íleo, é caracterizado por projeções conhecidas como vilosidades, que se estendem em direção ao lúmen intestinal e aumentam a área de superfície do epitélio digestivo. Entre as vilosidades encontramos as criptas de Lieberkühn, onde células tronco multipotentes darão origem a diferentes tipos de células epiteliais. A principal célula que constitui o epitélio do intestino delgado é o enterócito que, sendo recoberto em sua porção apical por microvilosidades, auxilia na digestão e na absorção dos nutrientes da dieta. Em menor proporção, encontramos a presença das células de Paneth, produtoras de peptídeos antimicrobianos, das células caliciformes produtoras e secretoras de muco e das células neuroendócrinas (MOWAT e AGACE, 2014). Em conjunto, estas células atuam na manutenção da barreira física e química da mucosa intestinal, possuem diferentes receptores da imunidade inata, produzem citocinas inflamatórias e peptídeos antimicrobianos.

O intestino grosso começa no cécum, seguido pelo cólon (ascendente, transverso e descendente) e o reto, terminando na região do ânus. Por ser caracterizado por um epitélio achatado, sem a presença das vilosidades, o intestino grosso tem pouca ou nenhuma função digestiva, sendo a absorção de água e a formação das fezes suas principais funções. O intestino grosso corresponde ao principal reservatório para os trilhões de microrganismos comensais que habitam o intestino (MOWAT e AGACE, 2014; VERNOCCHI et al., 2020).

Os seres humanos existem como metaorganismos, que são constituídos de pelo menos 10 vezes mais genes relacionados a microbiota comensal do que ao próprio genoma (LEY et al., 2006). Essa complexa comunidade de microrganismos que inclui principalmente bactérias, fungos e vírus

vivendo em uma condição de simbiose, desempenham papel fundamental na fisiologia do hospedeiro (BELKAID e HAND, 2014). Em todos os tecidos de barreira encontramos microrganismos, entretanto, é no intestino onde é encontrada a maior densidade e diversidade desses microrganismos vivendo em mutualismo com o organismo do hospedeiro, possibilitando por exemplo, a digestão de componentes da dieta, como as fibras, que seriam incapazes de serem digeridas e assim absorvidas pelo indivíduo (HAND et al., 2016).

A microbiota intestinal é capaz de influenciar diferentes sistemas do corpo, incluindo o sistema imunológico. O sistema imunológico intestinal é responsável principalmente por manter a homeostase do tecido intestinal. Para tanto, é necessário o bom desenvolvimento de uma imunovigilância que seja efetiva em impedir a invasão de microrganismos patogênicos, ao mesmo tempo que desempenhe um papel tolerogênico ao limitar as repostas imunológicas frente a presença e reconhecimento de componentes da dieta e da microbiota comensal (BELKAID et al., 2013; HAND et al., 2016). Uma estratégia central utilizada pelo sistema imunológico nos sítios de barreira para manter a relação homeostática com os membros da microbiota comensal, consiste em limitar o contato entre os microrganismos e a superfície da célula epitelial. No trato intestinal, essa segregação é mediada por uma ação combinada da presença de muco, peptídeos antimicrobianos, imunoglobulina (Ig) A, células epiteliais e células imunes (HOOPER et al., 2012; BELKAID et al., 2013; BELKAID e HAND, 2014).

A IgA específica para componentes da microbiota intestinal é produzida com auxílio das células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*) que presentes em uma região favorável de proximidade ao epitélio, projetam seus dendritos em direção ao lúmen intestinal e capturam antígenos comensais, que serão apresentados aos linfócitos T e B nas placas de Peyer (MACPHERSON e UHR, 2004). No trato intestinal sob condições homeostáticas, há o predomínio das populações de células T do padrão T auxiliar (Th, do inglês *T helper*) 17 produtoras de interleucina (IL)-17 e IL-22, Th1 produtoras de interferon gama (IFN- γ) e T reguladora (Treg) produtoras de IL-10. A diferenciação nestes padrões celulares ocorre em resposta aos antígenos alimentares e da microbiota que são apresentados pelas DCs, em especial as que expressam o cluster de diferenciação (CD) 103 e CD11b, que saem da lâmina própria em direção aos linfonodos drenantes da região intestinal (mesentéricos) (MLN, do inglês *mesenteric lymph nodes*) através dos vasos linfáticos mesentéricos (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009; IVANOV et al., 2008). A IL-17 e IL-22 desempenham função essencial na manutenção da barreira epitelial intestinal, enquanto, a IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) apresentam importante papel nos mecanismos de tolerância oral

(MUCIDA et al., 2005; WORBS et al., 2006; HOOPER e MACPHERSON, 2010; BELKAID e HAND, 2014; MOWAT e AGACE, 2014).

O intestino humano contém membros de diferentes filos de bactérias (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria), sendo que mais de 90% desses membros fazem parte dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (LEY et al., 2006). Diversos mecanismos são utilizados pelas células do sistema imunológico para detectar a presença dos componentes da microbiota intestinal. Um destes mecanismos se dá através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) presentes principalmente nas células do sistema imune inato e células epiteliais intestinais (HAND et al., 2016). Bactérias principalmente do filo Bacteroidetes são essenciais para o desenvolvimento e manutenção do tônus do sistema imune intestinal saudável (MAZMANIAN et al, 2005).

Contudo, a detecção direta dos microrganismos pelo sistema imunológico da mucosa intestinal não é a única maneira pela qual a microbiota pode influenciar o tônus da resposta imunológica no intestino. A microbiota intestinal é capaz de produzir uma série de metabólitos bioativos que podem influenciar a resposta imune do hospedeiro local e sistemicamente, e levando em consideração este aspecto, os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs, do inglês *Short-Chain Fatty Acids*) merecem destaque. Os SCFAs, como o acetato, propionato e butirato, são produzidos a partir da digestão anaeróbica de oligossacarídeos derivados do muco e da fibra dietética principalmente por bactérias na região do cólon, principalmente dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (MOWAT e AGACE, 2014). Estes metabólitos atuam como moléculas de sinalização, ativando receptores acoplados a proteína G (GPCRs, do inglês *G-Protein-Coupled Receptor*), incluindo o GPR41 e GPR43, sendo este último mais expresso em leucócitos (LE POUL et al., 2003). O GPR43 é preferencialmente ativado pelo acetato, e o GPR41 pelo butirato, enquanto o propionato ativa ambos os receptores (BROWN et al., 2003). Os SCFAs são produzidos no lúmen intestinal e são rapidamente absorvidos, sendo metabolizados principalmente pela mucosa intestinal, tecido hepático e muscular.

Em particular, o butirato tem a capacidade de aumentar a acetilação das histonas H3 no promotor do gene *Foxp3* das células Treg no cólon, auxiliando na indução e na manutenção destas células (FURUSAWA et al., 2013; ARPAIA et al., 2013). O acetato, propionato e butirato são capazes de conduzir a expansão de células Treg produtoras de IL-10 no cólon, de maneira

dependente de GPR43 (SMITH et al., 2013). Particularmente o butirato, demonstrou diminuir a expressão de genes relacionados a patogenicidade de bactérias invasoras do gênero *Salmonella*, necessários para a invasão do epitélio intestinal (GANTOIS et al., 2006). Adicionalmente, a diminuição de bactérias produtoras dos SCFAs está associada ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal (SOKOL et al., 2009).

1.2 – A microbiota e as infecções intestinais

Em associação a indução e manutenção do tônus da resposta imunológica e da manutenção da integridade do epitélio intestinal, a microbiota comensal desempenha papel crucial na proteção do hospedeiro frente a invasão por patógenos. Este mecanismo mediado pela microbiota comensal foi descrito há mais de 40 anos como resistência a colonização (VAN DER WAAIJ et al., 1971). A interação entre a microbiota e os microrganismos invasores está relacionada ao fato de que ambos os organismos competem pelo mesmo nicho ecológico. Conseqüentemente, a microbiota comensal interfere na colonização dos patógenos principalmente dispondo de mecanismos que impeçam o crescimento do patógeno, como através do consumo dos nutrientes disponíveis e da produção de bacteriocinas (KAMADA et al., 2013). Além disso, a microbiota comensal pode dispor de mecanismos que propiciem um ambiente hostil para o estabelecimento de patógenos, como por exemplo, reduzindo o potencial hidrogeniônico (pH) (TUROVSKIY et al., 2011).

Mesmo dispondo de uma série de mecanismos que auxiliam na manutenção da barreira intestinal frente a invasão por patógenos, alterações na composição e função da microbiota intestinal como resultado, por exemplo, do uso de antibióticos e de alterações na composição da dieta, podem facilitar a invasão por microrganismos patogênicos (BELKAID E HAND, 2014). Além disso, pelo fato de a microbiota intestinal desempenhar função essencial na modulação da homeostase intestinal, alterações em sua composição podem predispor ao início ou progressão de doenças como, distúrbios imunológicos, inflamatórios e metabólicos, bem como o câncer (VERNOCCHI et al., 2020). As infecções agudas que acometem a mucosa intestinal são caracterizadas por mudanças significativas na composição da microbiota, associada a dominância de bactérias com propriedades invasivas e inflamatórias, que podem diretamente exacerbar a inflamação e, conseqüentemente conduzir a danos teciduais (LUPP et al., 2007).

No contexto de infecções na mucosa intestinal, por conta da microbiota e dos patógenos invasores compartilharem do mesmo ambiente, e como consequência da quebra de barreira e do aumento da permeabilidade intestinal associados a inflamação gerada devido a infecção, pode haver translocação da microbiota intestinal para outros tecidos do corpo, intensificando assim a inflamação (BRENCHLEY e DOUEK, 2012; BELKAID et al., 2013; BELKAID e HAND, 2014). Nesse sentido, mediante determinados casos de infecção, poderá haver na mucosa intestinal a ativação e diferenciação para um padrão inflamatório, tanto das células T específicas para os componentes do patógeno, quanto das células T específicas para a microbiota, resultando em inflamação e quebra da tolerância aos microrganismos comensais (HAND et al., 2012). Estudos realizados em modelos de infecção intestinal causadas pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, e pela bactéria gram-negativa YP, e em modelos de infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human immunodeficiency virus*), observaram a ocorrência de translocação de bactérias comensais, a diminuição da população de células Treg no intestino, a perda da tolerância oral e ao desenvolvimento de inflamação de baixo grau, que está intimamente relacionado ao aumento da permeabilidade intestinal e a consequente translocação da microbiota (HEIMESAAT et al, 2006; HAND et al., 2012; FONSECA e HAND et al., 2015; BRENCHLEY et al., 2006; BRENCHLEY e DOUEK, 2012; ESTES et al., 2010). Em alguns casos essa inflamação pode auxiliar na eliminação do patógeno, porém, quando em excesso, pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas, como a doença inflamatória intestinal. Ainda, esse status inflamatório pode desenvolver-se sistemicamente em outros órgãos, como o tecido adiposo.

1.3 – A microbiota intestinal e a relação ao desenvolvimento de doenças inflamatórias

A inflamação de baixo grau no tecido adiposo tem implicação no desenvolvimento de síndrome metabólica e resistência à insulina, fatores que estão intimamente relacionados a obesidade (HOTAMISLIGIL, 2006). CANI et al. em 2007 propôs que os lipopolissacarídeos (LPS), componentes da membrana de bactérias gram-negativas, sejam o fator desencadeante dessa inflamação de baixo grau no tecido adiposo durante a obesidade. Esta hipótese tem como fundamento: (1) através da ligação ao complexo CD14 e ao receptor do tipo Toll 4 (TLR4, do inglês *Toll Like Receptor 4*) expressos na superfície das células imunes, principalmente da imunidade inata, o LPS desencadeia a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e o

fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *Tumor Necrosis Fator Alfa*) (WRIGHT et al., 1990); (2) o LPS encontra-se presente em grande quantidade na microbiota intestinal, devido à presença das bactérias gram-negativas na sua composição, e é fisiologicamente transportado através dos enterócitos para o linfonodo mesentérico de maneira dependente de TLR4 (NEAL et al., 2006); (3) o LPS pode ser transportado do intestino por um mecanismo facilitado por quilomícrons sintetizados pelas células epiteliais intestinais em resposta a digestão de alimentos ricos em gordura (VREUGDENHIL et al., 2003).

Nos últimos anos é crescente o interesse pelo estudo da associação entre as modificações na composição da microbiota intestinal, decorrentes de alterações nos componentes da dieta, infecções, sedentarismo, uso de antibióticos, e sua relação com o desenvolvimento de doenças como a obesidade, síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares. Nessa linha, um estudo comparando a composição da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e de indivíduos com doença inflamatória intestinal sem e com inflamação tecidual, demonstrou a presença reduzida de bactérias do filo Firmicutes neste último grupo (WALKER et al., 2010). A mesma redução também foi observada em indivíduos diagnosticados com diabetes do tipo 2, sendo que o grau de alteração da composição da microbiota intestinal correlacionava-se aos níveis plasmáticos de glicose, sugerindo que a microbiota disbiótica desempenha efeito direto na patogênese do diabetes do tipo 2 (LARSEN et al., 2010). Em modelo experimental de camundongos NOD (do inglês, *Non-Obese Diabetic*), geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento de diabetes tipo 1, foi mostrado recentemente que a microbiota comensal apresenta uma contribuição essencial para o desenvolvimento da doença (MIRANDA et al., 2019).

A obesidade é uma doença crônica, e o seu desenvolvimento está relacionado a fatores genéticos, a alimentação inadequada, com alto teor de gordura, açúcar e sal, ao sedentarismo e as modificações na composição da microbiota intestinal. Trata-se do distúrbio metabólico mais frequente no mundo e é o principal fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade no mundo quase triplicou desde 1975. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos (18 anos de idade ou mais) apresentaram excesso de peso, e destes 650 milhões estão em condição de obesidade (WHO, 2020). No Brasil, dados de 2019 demonstram que 96 milhões de adultos estavam em sobrepeso e mais de 41 milhões estavam em situação de obesidade (IBGE, 2019).

Devido ao excesso de nutrientes provenientes de uma alimentação rica em gordura, o organismo é exposto a um estresse nutricional, que associado a expansão do tecido adiposo,

promovem uma série de sinais intrínsecos (por exemplo, hipóxia, morte de adipócitos) que conduzem o início da resposta inflamatória neste tecido. A desregulação imunológica no tecido adiposo, pâncreas e fígado de indivíduos obesos resulta no aumento da infiltração e ativação de leucócitos, tanto da resposta imune inata quanto adquirida, para estes tecidos. Particularmente, os macrófagos são as células mais abundantes que infiltram e que se acumulam no tecido adiposo de indivíduos obesos, constituindo cerca de 40% de todas as células neste compartimento tecidual (LEE et al., 2018; ZATTERALE et al., 2019) e são os principais responsáveis pela produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e IL-1 β com potencial de induzir a resistência à insulina local e sistemicamente através, por exemplo, da inibição da sinalização *downstream* PI3K/Akt do receptor de insulina (XU et al., 2003; RIDAURA et al., 2013). Investigações da expressão de citocinas inflamatórias identificaram as quinases: c-jun N-terminal (JNK, do inglês c-jun N-terminal kinase), inibidor da quinase K (IKK, do inglês inhibitor of κ kinase) e a proteína quinase R (PKR, do inglês protein kinase R), como os principais constituintes intracelulares para a indução de inflamação em tecidos metabólicos. Comparado aos controles magros, o tecido adiposo e o fígado de obesos apresentam aumento acentuado na ativação dessas quinases e de suas cascatas de sinalização *downstream* (SOLINAS e KARIN, 2010; NAKAMURA et al., 2010).

Diversas populações celulares contribuem para manter a homeostase e o crescimento do tecido adiposo, incluindo pré-adipócitos, células da imunidade inata e adquirida, fibroblastos e células vasculares (OUCHI et al., 2011). Em homeostase, as células imunológicas do tipo 2 predominam no tecido adiposo, incluindo os eosinófilos, células linfoides inatas do tipo (ILC, do inglês *Innate Lymphoid Cells*) 2, macrófagos “M2” alternativamente ativados, células *natural killer*, Th2 e Treg. Em particular, as citocinas produzidas pelas ILC2 e Th2, como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 contribuem para a manutenção da homeostase metabólica no tecido adiposo e a sensibilidade à insulina (WU et al., 2011; MORO et al., 2010; MOLOFSKY et al., 2013; BRESTOFF et al., 2015; ODEGAARD e CHAWLA, 2015).

Além da associação entre uma alimentação hipercalórica e a obesidade, Gordon et al., observaram alterações na microbiota intestinal em obesos. Estas alterações estavam relacionadas ao aumento da presença de bactérias Firmicutes e redução de Bacteroidetes, que possibilitava ao hospedeiro um fornecimento maior de energia a partir da dieta (TURNBAUGH et al., 2006). Os primeiros estudos que relacionaram a microbiota intestinal e a obesidade, foram realizados em animais livres de microrganismos (GF, do inglês *Germ Free*). Foi observado que a ausência da microbiota era acompanhada da menor presença de tecido adiposo, mesmo em condições de maior ingestão de comida, e que o transplante da microbiota fecal de

camundongos *naïves* para camundongos GF conferia aumento da gordura corporal, acompanhado de resistência à insulina, hipertrofia de adipócitos e aumento na glicemia destes animais. Estas observações foram em parte associadas à capacidade da microbiota intestinal em degradar os polissacarídeos da dieta em monossacarídeos, que são absorvidos e que levam ao aumento da lipogênese hepática no hospedeiro, e devido a supressão da expressão intestinal de angiopoietina 4, um inibidor da lipase lipoproteica (BACKHED et al., 2004). Em um outro estudo, foi demonstrado que o transplante da microbiota intestinal proveniente de camundongos obesos para camundongos GF levou ao aumento de peso dos animais receptores (TURNBAUGH et al., 2008).

A síndrome metabólica está intimamente relacionada a obesidade. Por definição, a síndrome metabólica não consiste em uma doença, mas em fatores de risco que estão associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes. Resistência à insulina, obesidade visceral, hipertensão, altos níveis séricos de triglicérides acompanhados de baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*) fazem parte dos fatores de risco envolvidos na síndrome metabólica, que é assim caracterizada quando dois ou mais desses fatores estão presentes. Quanto mais fatores de risco associados a síndrome metabólica um indivíduo apresentar, maiores são as chances do desenvolvimento das doenças associadas (SAMSON e GARBER, 2014).

Além do tecido adiposo, em indivíduos obesos também há o comprometimento e inflamação no tecido pancreático e ambos relacionam-se com o processo de síndrome metabólica. Essas comorbidades e a microbiota intestinal têm papel fundamental na homeostase energética do hospedeiro e estão associadas ao comprometimento tanto do metabolismo de carboidratos, quanto do metabolismo de lipídeos. Em relação ao metabolismo de carboidratos, o pâncreas é um dos órgãos que merece destaque, principalmente por sua porção endócrina, responsável pela produção de uma série de hormônios peptídicos que apresentam grande importância para o metabolismo de carboidratos. No pâncreas encontramos as ilhotas de Langerhans, que são agrupamentos celulares constituídos principalmente pelas células α , β e γ . As células α são responsáveis pela produção de glucagon, responsável em aumentar a glicemia através do estímulo a glicogenólise hepática; as células β são produtoras de insulina e as células γ são produtoras de somatostatina (HALL, 2017).

1.4 – O metabolismo de carboidratos e lipídeos

A digestão dos carboidratos provenientes da dieta tem início na boca sob ação da amilase salivar que converte os polissacarídeos em oligossacarídeos, mas que tem sua ação inativada pela presença do pH ácido do estômago. No intestino delgado, haverá a liberação de bicarbonato que auxilia na neutralização do pH ácido do estômago, possibilitando a ação enzimática da amilase pancreática, que assim como a amilase salivar, é capaz de hidrolisar ligações presentes em porções lineares dos polímeros de glicose. Assim, os produtos de carboidratos não hidrolisados anteriormente por ação das amilases serão hidrolisados por enzimas presentes nas microvilosidades do intestino delgado, sendo também responsáveis pela digestão de dissacarídeos como a lactose e sacarose. Este complexo enzimático presente nas microvilosidades das células intestinais é composto principalmente pela glucoamilase, sucrase-isomaltase e lactase e sua ação enzimática dará origem aos monossacarídeos, como a glicose, frutose e galactose. Os carboidratos que são incapazes de serem digeridos no intestino delgado, como as fibras, são fermentados sob ação da microbiota presente no intestino grosso e darão origem aos SCFAs, por exemplo (SANDERS, 2016; NELSON e COX, 2013).

Os monossacarídeos são absorvidos pelos enterócitos, e por serem polares necessitam do auxílio de transportadores de membrana. A glicose e a galactose são absorvidas com auxílio do cotransportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1, do inglês *Sodium-Dependent Glucose Cotransporters 1*), enquanto a frutose tem seu transporte facilitado pelo transportador de glicose (GLUT, do inglês *Glucose Transporter*) 5. Há mais de 14 isoformas diferentes de GLUT que são expressos diferentemente pelas células do corpo (SANDERS, 2016). As células β pancreáticas captam a glicose presente na circulação sanguínea através do GLUT2, que sob fosforilação da hexoquinase é convertida em glicose-6-fosfato que entra na via glicolítica, no qual a energia gerada será convertida na forma de moléculas de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *Adenosine Triphosphate*) (MATSCINSKY, 1996).

Com o aumento dos níveis intracelulares de ATP, há o fechamento dos canais de potássio, com conseqüente despolarização da membrana celular e abertura dos canais de cálcio sensíveis a voltagem. O influxo de cálcio celular resulta na ativação da fosfolipase C promovendo a hidrólise de fosfolípidos de membrana, gerando inositol 1-4-5-trifosfato e diacilglicerol que promoverão a translocação dos grânulos contendo insulina para as proximidades da membrana celular e posterior exocitose, liberando assim a insulina para a circulação sanguínea (HABER et al., 2001; PRENTKI

e CORKEY, 1996). A insulina é capaz de diminuir a glicemia estimulando a captação da glicose por outros tecidos, como fígado, músculo e tecido adiposo. No fígado, a insulina é capaz de direcionar a glicose para a via de formação de glicogênio, através da ativação da glicogênio-sintase (NELSON e COX, 2013). Fatores que interferem tanto na secreção da insulina, quanto na resposta da ligação da insulina ao seu receptor, estão diretamente associados ao comprometimento do metabolismo dos carboidratos.

O metabolismo de lipídeos, por sua vez, inclui a biossíntese e degradação de lipídeos como os ácidos graxos, triglicérides e colesterol e tem início apenas no intestino delgado sob ação dos sais biliares que são responsáveis em emulsificar a gordura, facilitando a ação da lipase pancreática. As lipases hidrolisam ligações nas moléculas de lipídeos permitindo a liberação de ácidos graxos e glicerol, que serão absorvidos pelos enterócitos. Entretanto, como os triglicérides e colesterol são moléculas lipossolúveis, para que se tornem mais solúveis na circulação sanguínea são empacotados com proteínas transportadoras chamadas de apolipoproteínas (Apo), formando então os quilomícrons. As principais Apo são as ApoA (A-I, A-II e A-IV), ApoB (B-48 e B-100), ApoC (C-I, C-II, C-III), ApoD e ApoE (FRANCESCHINI, 1996). As Apo além de auxiliarem na solubilização das lipoproteínas, também as direcionam para os locais corretos do seu metabolismo.

Os quilomícrons ganham a circulação linfática através da ligação da ApoC-II, seguindo pela cisterna do quilo, ducto torácico e desembocando na veia subclávia esquerda onde ganham a circulação sanguínea. Durante esse processo são degradados pela ação da lipase lipoprotéica endotelial em ácidos graxos livres (FFAs, do inglês *Free Fatty Acids*) e glicerol. O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização dos lipídeos. No tecido hepático, os FFAs são utilizados no metabolismo energético ou convertidos em triacilgliceróis e ésteres de colesterol e empacotados com Apo específicas formando a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, do inglês *Very Low Density Lipoprotein*). Através das ApoC-II presentes na VLDL, os triacilgliceróis nessas lipoproteínas conseguem ser liberados para os tecidos alvos. À medida que a VLDL perde o conteúdo de triacilgliceróis e concentra-se em colesterol, é convertida em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL, do inglês *Intermediated Density Lipoprotein*), e em lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *Low Density Lipoprotein*).

A ApoB100 constitui a principal Apo presente na LDL, e a captação desta lipoproteína é mediada pela interação entre os resíduos de lisina presente na ApoB100 com os receptores específicos para a LDL (BROWN e GOLDSTEIN, 1986). A LDL é responsável pela entrega do

colesterol para o músculo, glândulas suprarrenais, tecido adiposo e também para os macrófagos (ARBEENY, 1996; NELSON e COX, 2013). Trata-se de uma lipoproteína indispensável ao fornecimento de colesterol, importante para o processo de divisão celular, para a síntese de membranas, e para a síntese de hormônios e sais biliares (BROWN e GOLDSTEIN, 1986). Em contrapartida, o transporte reverso do colesterol, que consiste em sua retirada dos tecidos periféricos em direção ao fígado, é realizado pela lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*). No fígado, o colesterol será utilizado principalmente para a síntese de sais biliares (NAVAB et al., 2011).

Há uma forte correlação envolvendo distúrbios relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos. Como por exemplo, a relação envolvendo a resistência à insulina e as dislipidemias. A hiperglicemia ocasionada pela resistência à insulina é um importante componente metabólico observado na obesidade, síndrome metabólica e diabetes e está associada ao elevado risco de complicações vasculares e em última instância associada ao fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BJORNSTAD e ECKEL, 2018).

1.5 – A microbiota e as infecções intestinais e sua relação com a aterosclerose

As doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose estão intimamente relacionadas ao metabolismo lipídico e representam a principal causa de morte no mundo, com uma estimativa de 17,9 milhões de morte só no ano de 2016 (WHO, 2017). A aterosclerose é caracterizada por uma inflamação crônica decorrente do acúmulo de colesterol, cálcio e outros elementos na parede das artérias, com consequente recrutamento de células imunológicas para o local, principalmente de macrófagos, conduzindo ao enrijecimento, estreitamento da parede do vaso e a formação do ateroma, podendo assim ser considerada uma doença inflamatória e metabólica (KOREN et al., 2011; LINDSKOG JONSSON et al., 2018; HANSSON, 2005). Com o passar dos anos, a área de obstrução do vaso sanguíneo aumenta, levando a restrição do fluxo sanguíneo para as regiões irrigadas, e consequentemente ao comprometimento do suporte de oxigênio e de nutrientes, representando um gatilho chave para o desenvolvimento de outras complicações cardiovasculares, como o derrame, o acidente vascular cerebral e o infarto.

A aterosclerose normalmente se desenvolve em locais específicos, onde o fluxo sanguíneo é mais turbulento, como nos pontos de ramificação das artérias. A inflamação se desenvolve como uma resposta ao estresse hemodinâmico e outros tipos de gatilhos (WICK et

al., 1995), como pelo acúmulo de formas morfológicamente distintas e modificadas de LDL, seguidos por infiltração celular, como os macrófagos e formação de células espumosas (PENTIKAINEN et al., 2000). Na região da túnica íntima das artérias, a LDL pode sofrer uma série de modificações, como oxidação (SCHUH et al., 1978), acetilação, etilação, metilação e glicação (STEINBRECHER et al., 1984). Acredita-se que as modificações que acontecem nas moléculas de LDL, especialmente na ApoB, que impossibilitam sua ligação ao receptor da LDL, e a oxidação estejam relacionados a aterogênese por meio do reconhecimento dessas moléculas pelos receptores *scavenger* presentes nos macrófagos, e como consequência há a formação das células espumosas (OREKHOV et al., 2014). Estas células carregadas de colesterol podem sofrer necrose, ocasionando dano tecidual e resposta inflamatória local, bem como ocasionar o recrutamento de outras células da resposta imune (TABAS et al., 2007; TABAS e LICHTMAN, 2017).

Os modelos murinos mais utilizados para o estudo de aterosclerose são nocautes para a ApoE (ApoE-KO, do inglês *knockout*) e nocautes para o receptor da LDL (LDLR, do inglês *LDL Receptor*) (VÉNIANT et al., 2001; ISHIBASHI et al., 1993; ZHANG et al., 1992). Os camundongos ApoE-KO apresentam níveis plasmáticos de colesterol total mais altos em comparação aos nocautes para o LDLR, e normalmente apresentam lesões ateroscleróticas graves mais rapidamente. Além disso, a deficiência da expressão de ApoE endógena leva a um desequilíbrio da carga de colesterol especificamente nos macrófagos, o que estimula a secreção de citocinas e proteases, desencadeando inflamação e a degradação da matriz extracelular (ISHIBASHI et al., 1993; NAKASHIMA et al., 1994). O modelo de camundongos ApoE-KO foram os primeiros geneticamente modificados capazes de desenvolver aterosclerose espontaneamente e desde então tem sido utilizado para o estudo dessa doença (PLUMP et al., 1992).

Alterações na microbiota intestinal também estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em particular a aterosclerose (KOREN et al., 2011; KARLSSON et al., 2012; JIE et al., 2017). A microbiota intestinal metaboliza nutrientes contendo metilamina, como colina, lecitina e L-carnitina para gerar trimetilamina (TMA, do inglês *Trimethylamine*), que é posteriormente convertida a N-óxido de trimetilamina (TMAO, do inglês *Trimethylamine N-Oxide*) pela flavina monooxigenase no fígado. Os níveis de TMAO foram correlacionados com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TANG et al., 2013; KOETH et al., 2013; WANG et al., 2014), e têm sido positivamente correlacionados ao tamanho das lesões aórticas. A transferência da microbiota intestinal de animais que produzem altas quantidades

de TMAO para camundongos ApoE-KO, demonstram aumento da capacidade microbiana de produção de TMA e aumento das lesões aórticas (GREGORY et al., 2015).

As infecções também tem sido relacionadas as alterações pró-ateroscleróticas nas células vasculares. Estas alterações incluem aumento da expressão e atividade do receptor *scavenger*, aumento da captação de colesterol e LDL modificado, aumento da expressão de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias e outros efeitos, como estímulo aos macrófagos na secreção de citocinas, levando à vulnerabilidade da placa aterosclerótica (EPSTEIN et al., 2000). Estudos epidemiológicos demonstram a associação entre as doenças cardiovasculares e infecções por bactérias do gênero *Clamídia*, e por infecções que conduzem a doenças periodontais, por exemplo (MATTILA et al., 1989; SAIKKU et al., 1992).

Nesse contexto, nosso grupo mostrou que um único episódio de infecção gastrointestinal aguda por YP foi capaz de ocasionar um processo chamado por nosso grupo de “cicatriz imunológica”, no qual após a eliminação da bactéria, observou-se a translocação da microbiota intestinal para o mesentério, associada a uma inflamação crônica no MAT. Esta inflamação crônica do mesentério está associada a um aumento da permeabilidade dos vasos linfáticos mesentéricos que leva a um desvio das DCs migratórias, que trafegam do intestino para os linfonodos mesentéricos. Estas DCs, são desviadas para o MAT, ou mesentério, e não atingem os linfonodos drenantes. Como consequência deste desvio das DCs, ocorre o comprometimento das respostas imunes canônicas ativadas na mucosa intestinal pelas DCs, em particular células Tregs e Th17 e ao comprometimento da produção de IgA. Neste sentido, as principais funções imunes desenvolvidas nesse local ficam prejudicadas, como a tolerância oral e a imunidade contra vacinas orais (FONSECA e HAND et al., 2015). O comprometimento da produção de IgA e da resposta Th17 pela cicatriz imunológica faz com que haja perda de compartimentalização da microbiota intestinal, que transloca para o mesentério, fechando o ciclo de *feedback* positivo para a inflamação crônica mesentérica.

Outro trabalho realizado por nosso grupo demonstra que após o episódio de infecção pela bactéria YP, há alteração da composição da microbiota intestinal e o desenvolvimento de uma síndrome metabólica não clássica. Esta síndrome é caracterizada por uma melhora significativa na sensibilidade à insulina, mesmo em condições de obesidade, e no uso de carboidratos como fonte de energia. A resposta à insulina está aumentada no músculo e no tecido adiposo dos animais e está associada à maior produção do hormônio peptídeo gástrico (GIP, do inglês *Gastric Inhibitor Peptide*) em decorrência de alterações da microbiota comensal

que levam ao aumento de determinadas espécies de proteobactérias. Esta melhora no metabolismo de carboidratos confere ao animal uma vantagem adaptativa mediante condições de desnutrição induzida por dietas deficientes em proteínas e lipídeos, mas baseadas em carboidratos (SIQUEIRA et al., manuscrito em preparo). Entretanto, a melhora do metabolismo de carboidratos está associada a uma ineficiência do uso de lipídeos como fonte energética. Os animais previamente infectados por YP sucumbem ao serem alimentados com dietas contendo baixo teor de carboidratos. Embora ainda não saibamos os mecanismos envolvidos neste fenômeno, acreditamos que o aumento da produção e sinalização pela insulina possa estar associado ao comprometimento dos processos de beta-oxidação, comprometendo o uso de lipídeos como fonte de energia. Além disso, essa incapacidade do uso de lipídeos pode estar associada ao dano permanente gerado nos vasos linfáticos mesentéricos em decorrência da infecção intestinal pela YP, observada pelo aumento da permeabilidade desses vasos e consequente interferência no tráfego de lipídeos provenientes da dieta. Esta observação pode ser evidenciada pela dificuldade dos animais previamente infectados com YP, em comparação aos animais *naïve*, de absorverem os lipídeos a curto prazo, assim como da presença de ascite quilosa na região abdominal desses animais. Dessa forma, compreender os processos envolvidos na manutenção da inflamação crônica do mesentério pós-cicatriz imunológica induzida por YP pode ser essencial para elaborar intervenções que revertam o dano aos vasos linfáticos mesentéricos e consequentes alterações metabólicas. Além disso, também não conhecemos as consequências a longo prazo das alterações no transporte e metabolismo lipídico que se desenvolvem pós-infecção por YP.

Tendo em vista o papel fundamental da microbiota intestinal, e sua associação a inflamação do tecido adiposo e consequente distúrbios metabólicos e cardiovasculares, neste trabalho estudamos diferentes estratégias de reversão da inflamação do tecido adiposo mesentérico desenvolvida após a infecção intestinal por YP, a partir da recuperação da resposta imune homeostática Th2 no tecido, e observar indiretamente as possíveis modificações na sensibilidade à insulina, bem como a contribuição dessa infecção intestinal na predisposição a longo prazo ao desenvolvimento de doença aterosclerótica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto do remodelamento mesentérico decorrente da infecção por YP sobre o desenvolvimento de síndrome metabólica não clássica, com ênfase na produção de SCFA, restauração do tônus imunológico Th2 no MAT e contribuição dos linfócitos B, e as consequências a longo prazo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar a contribuição da microbiota intestinal para a melhora da resposta à insulina pós-infecção;
2. Avaliar a contribuição dos SCFAs para a geração e manutenção da cicatriz imunológica e seu impacto sobre as alterações metabólicas;
3. Determinar o impacto da redução dos componentes do tipo 2 (eosinófilos, células Th2 e ILC2) sobre a inflamação crônica do tecido adiposo mesentérico e resposta à insulina;
4. Avaliar o efeito da inibição de NLRP3, via tratamento com glibenclamida sobre a inflamação no MAT e linfonodo mesentérico e sobre a síndrome metabólica não clássica;
5. Avaliar o efeito da tentativa de recuperação dos componentes do tipo 2 no MAT pós-infecção por YP a partir do uso da OVA por via oral e intraperitoneal e sobre a síndrome metabólica não clássica;
6. Estudar a contribuição dos linfócitos B para a síndrome metabólica não clássica;
7. Avaliar o impacto da infecção por YP sobre o metabolismo lipídico do hospedeiro, em particular no desenvolvimento de aterosclerose;
8. Avaliar o efeito da tentativa de reversão da inflamação crônica no MAT sobre a permeabilidade linfática no contexto de desenvolvimento de aterosclerose.

3. Materiais e Métodos

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos C57BL/6, fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas ao início dos experimentos, obtidos do biotério de criação animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) e foram mantidos no biotério de experimentação do departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. Os camundongos ApoE-KO e os camundongos deficientes em células B maduras que não expressam o gene μ da Ig (B-KO, ou μ KO) foram criados e mantidos no biotério de quarentena do departamento de Imunologia do ICB da USP, a partir de um casal de camundongos ApoE-KO e B-KO (cedidos pelo Prof. José Carlos Farias Alves Filho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP. Os animais ApoE-KO apresentam uma inativação do gene da apolipoproteína E endógena e para tanto demonstram aumento acentuado dos níveis plasmáticos de colesterol total, sendo que o acúmulo de gordura na região aórtica já pode ser observado a partir do terceiro mês de idade. Os camundongos ApoE-KO são comumente utilizados para estudos envolvendo aterosclerose, doenças cardiovasculares, metabolismo lipídico e a relação entre a apolipoproteína E e a doença de Alzheimer (PIEDRAHITA et al., 1992). Os camundongos B-KO são incapazes de expressar a imunoglobulina M ligada à membrana devido a uma mutação direcionada na região do éxon que codifica a cadeia pesada desta imunoglobulina. Desta forma, estes camundongos não possuem células B maduras (KITAMURA et al., 1991). Os experimentos foram conduzidos com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) da USP, protocolo nº 49/2016. A eutanásia dos animais foi realizada pela inoculação intraperitoneal de dose excessiva de anestésico, cetamina (375 mg/Kg) e xilazina (37,5 mg/Kg).

3.2 Infecção Oral

Para a infecção, a bactéria YP (cepa IP32777) ou a bactéria YP com deleção para o fator de virulência *Yersinia outer protein M* (Δ YopM) foi semeada em meio de cultura ágar MacConkey sem antibiótico e incubada em estufa a 25°C por 48 h. Posteriormente para o crescimento bacteriano, uma colônia isolada foi cultivada em meio líquido 2XYT (Becton,

Dickinson and Company) a 25°C por 18 h sob agitação de 200 rpm. Após o crescimento, a concentração das bactérias viáveis foi quantificada de acordo com a densidade óptica da cultura (obtida em 600 nm) interpolada em uma curva de crescimento bacteriano previamente padronizada no LabIM. Os camundongos foram mantidos em jejum de 12 h antes da infecção que foi realizada por gavagem de 200 µL de solução salina contendo 1×10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de YP WT ou YP Δ YopM. Todos os experimentos foram realizados após 4 semanas da infecção, tempo necessário para que haja a eliminação completa da bactéria.

3.3 Testes metabólicos

Os testes metabólicos para análise de tolerância à insulina e de tolerância à glicose foram realizados a partir de 4 semanas após a infecção oral com YP. Afim de avaliar a tolerância à glicose, a partir do teste de tolerância a glicose (GTT, do inglês *Glicose Tolerance Test*), os animais foram mantidos em jejum por 12 h e posteriormente foi aplicada injeção via intraperitoneal com 2 g/Kg de glicose (Reagen). A resposta à insulina foi observada através do teste de tolerância à insulina (ITT, do inglês *insulin tolerance test*), para tal, duas abordagens diferentes foram utilizadas. Na abordagem inicial, os animais foram submetidos ao jejum de 6 h seguido de injeção de 0,75 U / Kg de insulina (Novo Nordisk) na região intraperitoneal. Em uma segunda abordagem, os animais foram submetidos ao jejum de 12 h, e o alimento foi repostado na manhã seguinte, por um período de 2 h, normalizando assim o horário de ingestão alimentar dos animais. Após o período de alimento disponível, os animais foram postos novamente em jejum por 6 horas. Após esse período, foi injetado via intraperitoneal 0,75 U/Kg de insulina. Para o GTT e na primeira abordagem utilizada para o ITT a dosagem da glicemia foi realizada nos tempos: 0, 15, 30, 90 e 120 min após a injeção com glicose e insulina, respectivamente. Já na segunda abordagem utilizada para a realização do ITT, a dosagem da glicemia foi realizada nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30, 90 e 120 min após a injeção de insulina. A dosagem da glicemia foi realizada com o auxílio do medidor de glicemia Accu-Chek Active, Roche.

3.4 Transplante de microbiota fecal

Para o protocolo de transplante de microbiota fecal, camundongos C57BL/6 foram infectados ou não com a bactéria YP. Decorridas 4 semanas da infecção, o conteúdo intestinal dos animais *naïve* ou previamente infectados foi coletado em condições anaeróbicas, decantado, o sobrenadante foi coletado, filtrado e transplantado via gavagem para animais *naïve* com idade de 3 semanas. O procedimento foi repetido 4 vezes em dias alternados e, após 6 semanas, os animais foram submetidos a testes metabólicos, como o GTT e o ITT.

3.5 Dosagem dos SCFAs

As dosagens dos SCFAs foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo do laboratório de Imunoinflamação da Universidade de Campinas (Unicamp). Para tanto, as amostras de fezes dos animais controles e previamente infectados com a bactéria YP foram coletadas e pesadas em tubos de 1,5 mL e posteriormente trituradas e homogeneizadas em 100 µL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 40 mg de cloreto de sódio, 20 mg de ácido cítrico, 40 µL de ácido clorídrico (1 M) e 200 µL de butanol. Os tubos foram agitados com auxílio do vórtex por 2 min e centrifugados a $18.000 \times g$ por 15 min. O sobrenadante foi transferido para microtubos sendo que 1 µL foi injetado no cromatógrafo gasoso para que a dosagem fosse realizada. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um espectrômetro de massa GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu; ThermoFisher Scientific) e uma coluna Stabilwax capilar de sílica fundida (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA) revestida com polietileno glicol. As amostras foram injetadas a 250 °C usando uma razão de divisão de 25: 1. O hélio puro de alto grau foi usado como gás de arraste a 1,0 mL/min em fluxo constante.

3.6 Dieta Especial

Para os experimentos relacionados a indução de aterosclerose nos animais ApoE-KO, decorridas 3-4 semanas da infecção por YP Δ YopM ou YP WT, os grupos experimentais foram

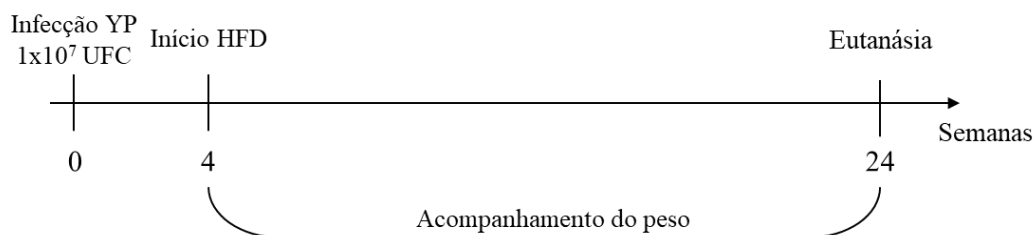
submetidos a dieta controle ou a HCD, contendo colesterol e ácido cólico (Tabela 1). A HCD foi fabricada e comercializada pela empresa RHOSTER (RH19550).

Dietas	Controle	Hipercolesterolêmica
Perfil calórico (%)		
Proteína	63,9	16,95
Carboidrato	17,2	49,33
Gordura	18,8	20,95

Tabela 1. Principais componentes das dietas controle e hipercolesterolêmica. Porcentagem do perfil calórico dos principais constituintes das dietas controle e hipercolesterolêmica.

3.7 Delineamento experimental para indução de lesões ateroscleróticas

Para a indução das lesões ateroscleróticas utilizamos o modelo de animais ApoE-KO. Estes camundongos foram os primeiros geneticamente modificados capazes de desenvolver aterosclerose espontaneamente e desde então tem sido utilizados para o estudo de doença aterosclerótica (PLUMP et al., 1992). O desenvolvimento de aterosclerose nos animais ApoE-KO pode ser acelerado a partir do uso de uma dieta rica em gordura como a HCD (NAKASHIMA et al., 1994). Afim de avaliarmos a predisposição ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas após um único episódio de infecção intestinal aguda por YP, camundongos ApoE-KO foram infectados com YP Δ YopM. Após 3-4 semanas, iniciou-se a dieta HCD por 20 semanas (esquema 1). Ambos os grupos tiveram seu peso medido semanalmente.



Esquema 1: Delineamento experimental para indução de lesões ateroscleróticas. Camundongos ApoE-KO foram infectados com YP Δ YopM. Decorridas 4 semanas, iniciou-se dieta HCD por 20 semanas.

3.8 Análise histopatológica

Após a eutanásia dos camundongos ApoE-KO previamente infectados com YP WT ou YP Δ YopM e tratados durante 20 semanas com HCD, órgãos como fígado e tecido adiposo pericárdico foram coletados e fixados em formaldeído 10% (Synth) para posterior coloração em hematoxilina e eosina (HE), utilizada para avaliar a morfologia e infiltrado celular desses órgãos. As peças foram enviadas à empresa HistoCell para processamento em parafina, seguido de corte, com cerca de 5 μ m, e coloração com HE.

3.9 Coleta do coração e aorta para histologia

Camundongos ApoE-KO foram infectados com YP Δ YopM, após 4 semanas, iniciou-se o tratamento com a HCD em ambos os grupos experimentais, por 20 semanas (de acordo com o esquema 1). Para a dissecação das aortas, os camundongos foram eutanasiados, o sangue foi coletado através da punção cardíaca e a caixa torácica exposta. Realizou-se perfusão cardíaca via ventrículo esquerdo com 10-40 mL de PBS (do inglês – *Phosphate Buffer Saline*) 1X, para eliminar o excesso de hemácias na aorta. Em seguida, retirou-se cuidadosamente o coração e a aorta ascendente e com auxílio de uma lupa de dissecação foi realizado o corte na região do arco da aorta, preservando ao máximo a região das válvulas. Os corações foram mantidos em PBS 1x por uma hora para relaxamento da musculatura e posteriormente foram fixados em formalina a 10% tamponado, pH de 7,4, por 48 h para preparação dos cortes histológicos.

3.10 Preparação dos cortes histológicos do coração

A inclusão do coração para corte em lâminas para análise das válvulas cardíacas (VCs) foi realizada em três soluções de diferentes concentrações de gelatina: inicialmente, solução a 5% de gelatina (Sigma) por três horas, a 10% por três horas e a 25% *overnight*, sendo que todas as etapas ocorreram em banho-maria (temperatura entre 40-50 °C). Com auxílio de uma lupa, os ventrículos foram seccionados entre o ápice e a base em um plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Posteriormente, foram embebidos no meio *Tissue Tek*

O.C.T (do inglês, *Optimum Cutting Temperature*) e congelados imediatamente com auxílio do gelo seco e armazenados em freezer -80 °C até o momento dos cortes histológicos. Dentro da câmara de congelamento do criostato (modelo Leica CM1950, Leica), cortes com 20 µm de espessura foram desprezados até a proximidade da região de interesse (VCs). Os cortes consecutivos com 5 µm de espessura foram coletados em lâminas de microscopia silanizadas. Os cortes coletados compreenderam a região entre o sinus aórtico e o início da aorta. Foram coletadas cerca de 4 lâminas por coração. Para a identificação do início da região de coleta as referências anatômicas utilizadas foram o formato arredondado da válvula e a presença de saliências em sua parede interna (constituem o início da formação das VCs). O desaparecimento das válvulas indicou o fim da região de coleta.

3.11 Coloração dos corações com *oil red*

Para a observação do depósito de lipídeos na região das VCs os cortes histológicos provenientes dos camundongos que foram previamente infectados com YP foram corados com *oil red- O* (Sigma). Para tanto, os cortes histológicos foram fixados em paraformaldeído a 4% por 10 min, seguido da lavagem com água corrente. Posteriormente, os cortes foram deixados em solução de trabalho de *oil red- O* (Sigma) (30 mL de solução estoque/ 20 mL de água destilada, filtrados em papel filtro) por 10 min. Solução estoque de *oil red* (500g de *oil red*/ 100 mL de isopropanol). Em seguida, os cortes foram corados com solução de número 3 do kit panótico rápido (composto de triazinas e água destilada) (Laborclin ®) por 30 segundos, seguido da lavagem em água corrente. Decorrido esse tempo, os cortes foram lavados em água corrente e as lâminas foram montadas com lamínula e glicerol 90% para posterior observação em microscópio.

3.12 Coloração das aortas com *oil red*

Foi utilizada a coloração de *oil red- O* (Sigma) para avaliar a presença de placas ateroscleróticas ou deposição de lipídeos nas aortas dos camundongos que foram previamente infectados com YP WT e YP ΔYopM. As aortas previamente obtidas foram transferidas para microtubos de 2 mL (ependorf) com paraformaldeído a 4% diluído em PBS 1x durante 24 h.

Com o auxílio de uma lupa, as aortas foram dissecadas para retirar o excesso do tecido adiposo na região externa. Subsequentemente à limpeza das aortas, as mesmas foram transferidas para tubos contendo 1 mL de metanol 78%, onde ficaram sob agitação por 5 min. Esse procedimento foi realizado mais duas vezes. Em seguida, adicionou-se 1 mL de *oil red* 0,2% (70mg *oil red* / 25 mL metanol /10 mL NaOH a 1 M) e as amostras foram incubadas por 60 min sob agitação. Decorrido esse tempo, as aortas foram transferidas para um novo tubo e lavadas 2 vezes com metanol 78%. Finalmente, as aortas foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1X estéril e armazenadas à 4°C até serem analisadas.

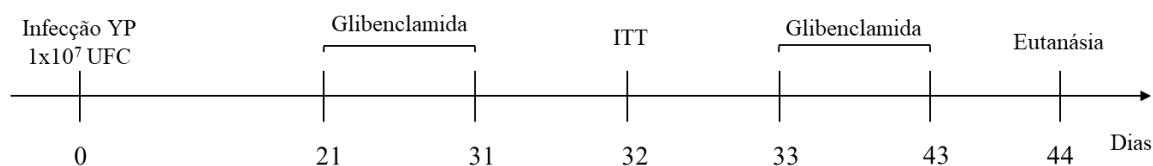
3.13 Análise da área da placa aterosclerótica

Para medir a área da placa aterosclerótica das aortas dos camundongos que foram previamente infectados com YP e YP Δ YopM, as aortas foram cortadas longitudinalmente e fixadas com auxílio de alfinetes em uma superfície plana e clara (MANZANO et al., 2015). Com auxílio do programa de análises de imagem ImageJ, obtivemos a área total da aorta e circundamos todas as regiões de área avermelhada presente no interior da aorta, característica do depósito de lipídeos presente na artéria após a coloração com *Oil-red*. Assim, obtivemos uma relação referente as áreas dos depósitos de gordura presente na aorta e a área total da aorta, e com um cálculo de soma e divisão chegamos ao valor da área total de placa aterosclerótica presente na aorta analisada. Posteriormente, utilizamos do programa GraphPad Prism 7.0 para visualização desses dados na forma de gráficos.

3.14 Delineamento experimental para o tratamento com glibenclamida

Na tentativa de diminuir a inflamação observada nos linfonodos mesentéricos e no MAT, bem como as alterações na sensibilidade à insulina geradas após a infecção intestinal por YP (FONSECA e HAND et al., 2015; SIQUEIRA et al., manuscrito em preparo), camundongos C57BL/6, fêmeas, foram infectados com a bactéria YP. Após 4 semanas, iniciou-se o tratamento com 10 μ g/animal do fármaco glibenclamida (descrito por sua capacidade de inibir NLRP3) (ZHANG et al., 2017) em solução salina ou apenas salina, por via intraperitoneal (200 μ L/animal), por 10 dias consecutivos. Posteriormente, realizou-se o ITT, seguido de mais 10 dias consecutivos com o tratamento por via intraperitoneal com glibenclamida (esquema 2). Os

animais foram eutanasiados e o MAT e linfonodos mesentéricos foram coletados para análise do perfil celular imune por citometria de fluxo.

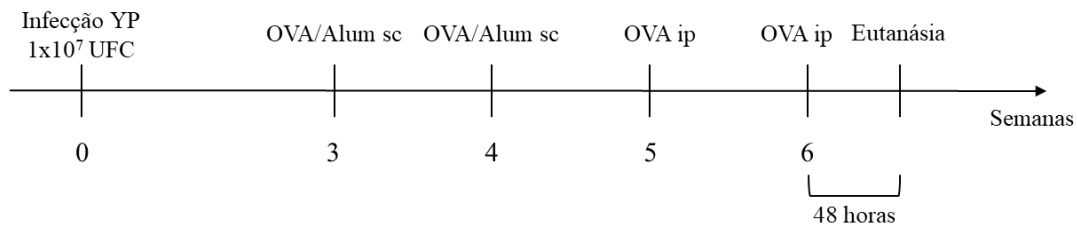


Esquema 2: Delineamento experimental para indução de lesões ateroscleróticas. Camundongos C57BL/6 foram infectados com YP. Decorridas 4 semanas, iniciou-se o tratamento por 10 dias consecutivos com glibenclamida por via intraperitoneal, seguido de ITT e novamente um ciclo de 10 dias de tratamento com o fármaco.

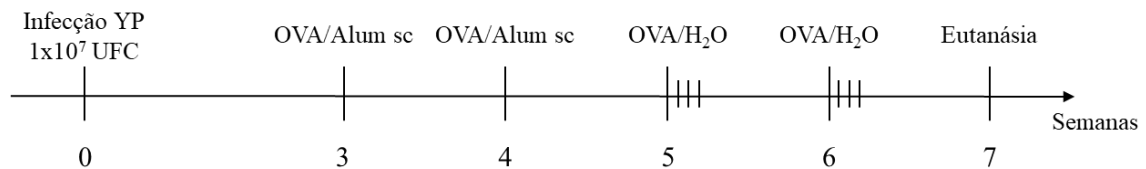
3.15 Delineamento experimental para indução de uma resposta imunológica do tipo 2 no MAT

Na tentativa de restaurar a resposta imune homeostática do tipo 2 no MAT dos animais previamente infectados com YP, camundongos fêmeas C57BL/6 *naïve* ou previamente infectados com YP foram submetidos ao protocolo de indução de resposta imunológica do tipo 2 a partir da imunização com o uso do antígeno OVA associado ao adjuvante hidróxido de alumínio (alum) (Thermo Scientific™), que polariza para respostas Th2. Para tanto, os animais foram imunizados com duas injeções de 200 µL de OVA/alum pela via subcutânea (sc) na região lombar dos animais. As injeções foram aplicadas com um intervalo de uma semana. A OVA encontrava-se em estoque na concentração de 100 µg/µL, e cada animal recebeu o equivalente a 50 µg de OVA e 100 µL de alum diluídos em solução salina injetável estéril. Após a imunização via subcutânea de OVA/alum, duas abordagens experimentais diferentes foram adotadas para a realização do desafio com OVA, com o intuito de direcionar a resposta Th2 para o mesentério ou para a mucosa intestinal (esquema 3). Na primeira abordagem experimental foram aplicadas duas injeções pela via intraperitoneal (ip) de 200 µL de solução com 100 µg OVA (concentração de 100 µg/µL) e solução salina suficiente para completar o volume de 200 µL, respeitando um intervalo de uma semana entre as aplicações (protocolo 1). Em uma segunda abordagem experimental, os animais receberam 1,5% de OVA (Sigma – Grau III) na água de beber durante três dias consecutivos, sendo o mesmo procedimento repetido novamente com um intervalo de uma semana (protocolo 2). Após realização dos protocolos 1 e 2 o MAT, linfonodo mesentérico e intestino dos animais foram coletados para imunofenotipagem celular por citometria de fluxo.

Protocolo 1



Protocolo 2



Esquema 3: Delineamento experimental para indução de um padrão de resposta imunológica do tipo 2.

Camundongos C57BL/6 foram infectados com YP. Após 3-4 semanas foram sensibilizados duas vezes pela via subcutânea com OVA/alum, com intervalo de uma semana entre elas. **Protocolo 1:** Para imunização, os animais receberam duas injeções via intraperitoneal (ip) de 200 μ L de solução com 100 μ g OVA e solução salina, em um intervalo de uma semana entre as aplicações. **Protocolo 2:** Para imunização, os animais receberam 1,5% de OVA na água de beber por três dias consecutivos. Após uma semana o procedimento foi novamente repetido.

3.16 Delineamento experimental para indução de uma resposta imunológica do tipo 2 em modelo de desenvolvimento de aterosclerose

Na tentativa de observarmos se a indução de uma resposta imune do tipo 2 no MAT dos animais previamente infectados com YP seria capaz de proteger estes animais do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e dos danos aos vasos linfáticos mesentéricos, camundongos fêmeas ApoE-KO entre 8 e 10 semanas de idade foram infectados com YP e após 4 semanas de infecção, os animais começaram a receber a dieta HCD por 20 semanas (descrito em 3.7) e foram submetidos ao protocolo de indução de resposta imunológica do tipo 2, a partir da utilização de OVA pela via intraperitoneal (protocolo 1, descrito no item 3.15). Decorridas 20 semanas do tratamento com a dieta, os animais ApoE-KO foram eutanasiados. O MAT foi coletado para avaliação da integridade dos vasos linfáticos (descrito em 3.18) e após perfusão corpórea através do ventrículo esquerdo, com PBS 1x gelado, a aorta foi coletada para avaliação das lesões ateroscleróticas (descrito em 3.12).

3.17 ELISA

Para a dosagem dos anticorpos IgG1, IgG2a e IgA específicos para OVA no soro dos camundongos, realizamos o ensaio de imunoabsorção enzimática ou ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando os kits OptEIA (BD Biosciences) seguindo as recomendações do fabricante.

Para a detecção dos anticorpos no soro, inicialmente realizamos o *coating* da placa com tampão *coating* e OVA na concentração de 10 µg/mL e incubamos *overnight* a 4 °C. Posteriormente, vertemos as placas e os poços foram lavados com o tampão de lavagem e bloqueados com solução de bloqueio por uma hora em temperatura ambiente. As amostras de soro foram devidamente diluídas e plaqueadas nos poços, seguido de incubação por duas horas em temperatura ambiente. As placas foram vertidas, e os poços lavados com solução de lavagem. Os respectivos anticorpos de detecção foram devidamente diluídos em tampão de bloqueio e pipetados nos poços, seguido de incubação por uma hora em temperatura ambiente. Após as placas serem vertidas e os poços lavados, pipetamos a enzima peroxidase conjugada a streptoavidina e incubamos por 30 min em temperatura ambiente. Seguimos com a lavagem dos poços e adição de solução de tetrametilbenzidina por 30 min em temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente realizamos a parada da reação com o uso de ácido sulfúrico e a leitura das placas foi realizada a 450 nm.

3.18 Gavagem com *bodipy*

Para avaliar a integridade dos vasos linfáticos mesentéricos, os camundongos ApoE-KO foram deixados em jejum por 4 h. Após este período, realizou-se a gavagem de 200 µL de uma emulsão contendo 2 µg de *bodipy*/por animal (do inglês, *4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene*) (Invitrogen™), creme de leite e azeite de oliva. Após 2 horas da gavagem, o MAT foi removido cuidadosamente, afim de evitar o corte dos vasos linfáticos mesentéricos e consequente extravasamento do seu conteúdo para o tecido adiposo mesentérico. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência no comprimento de onda de excitação de 488 nm.

3.19 Processamento tecidual e extração celular

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

Para o MAT e o pAT utilizou-se do protocolo descrito previamente em FONSECA e HAND et al., 2015. Para tanto, ambos os tecidos foram coletados após perfusão cardíaca com PBS gelado, cortados em pequenos fragmentos e digeridos com 0,5 mg/mL de Colagenase IV e 0,25 mg/mL DNase I em meio DMEM (Corning Inc.; Nova York, EUA) contendo 1% de albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin - BSA low fat*) tamponado com HEPES. Após digestão e inibição das enzimas por adição de 0,5 mM de EDTA, as células foram ressuspensas em meio RPMI com 3% de SFB. Quanto ao linfonodo mesentérico, a digestão foi realizada com 0,5 mg/mL Colagenase IV e 0,25 mg/mL DNase I em meio RPMI incompleto. Após digestão por 20 min a 37°C e inibição das enzimas por adição de meio RPMI com 3% de SFB e 0,5mM de EDTA, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI com 3% SFB.

Para a extração celular do fígado, realizou-se a coleta do órgão após perfusão cardíaca com PBS gelado, corte do tecido e digestão com 0,5 mg/mL Colagenase IV e 0,25 mg/mL DNase I em meio RPMI, por 25 min a 37°C, sob agitação. Após a digestão, o tecido foi

ressuspensão em percoll (Sigma-Aldrich) e centrifugado por 20 min a 1700 rpm. As células obtidas foram lavadas em RPMI com 3% de SFB e filtradas em *cell strainer*. Posteriormente, as células foram ressuspensas em RPMI com 3% de SFB.

Para extração dos leucócitos presentes nas VCs, inicialmente realizou-se a retirada do coração após a punção cardíaca e perfusão com o uso de PBS 1x. Posteriormente com auxílio de uma lupa e de um bisturi, realizamos cortes nos átrios e ventrículos, paralelos a região das VCs. Para a digestão, utilizamos 2 mg/mL de Colagenase IV e 0,25 mg/mL DNase I em HBSS, com três incubações de 20 min a 37°C, sob agitação. Após cada incubação, o sobrenadante foi recolhido em Falcon de 15 mL contendo uma solução de RPMI a 3% de SFB, e mantido em gelo. A suspensão celular foi então filtrada em *cell strainer*, seguido da centrifugação a 400 g, por 10 min. Posteriormente, as células foram ressuspensas em HBSS com 2% de SFB.

3.20 Análise das populações celulares por citometria de fluxo

Após a extração das populações celulares, foram feitas marcações para a imunofenotipagem de células do sistema imune inato (neutrófilos, eosinófilos, DCs, macrófagos e monócitos, células NK e células linfoides inatas) e análise do infiltrado linfocitário (linfócitos T CD4 e T CD8, linfócitos B, linfócitos TCR $\gamma\Delta$), além da avaliação do perfil de produção de citocinas por essas células. Para marcação extracelular, as células extraídas foram transferidas para uma placa de fundo “U” de 96 poços e lavadas com tampão HBSS (do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*) (Hyclone). Na placa no qual a marcação de células do sistema imune inato foi realizada, adicionou-se 10 μ L de suspensão contendo 3000 *beads* fluorescentes para contagem celular (Beckman Coulter®; Brea, Califórnia, EUA). Posteriormente a centrifugação da placa, realizou-se a marcação de viabilidade celular utilizando *Live and Dead* (LD) (Invitrogen™ *Molecular Probes*) em tampão HBSS, por 20 min a 4°C, sob proteção da luz. Posteriormente, as células foram lavadas em tampão FACS (PBS + 2% SFB), seguido da adição de 30 μ L/por poço de *mix* de anticorpos em tampão FACS, por 30 min a 4°C, sob proteção da luz. Após o término da incubação, a placa foi lavada com tampão FACS, e nos casos em que não havia marcação intracelular, passou-se para a etapa de fixação com paraformaldeído a 2%, por 20 min à temperatura ambiente.

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

Para avaliar o perfil de produção de citocinas, as células extraídas foram pipetadas em uma placa de 96 poços, “fundo reto” e incubadas em estufa à 37 °C, com 5% de CO₂ com uma solução de estímulo contendo 50 ng/mL de *Phorbol myristate acetate* - PMA (Invitrogen™), 500 ng/mL de Ionomicina (Invitrogen™), na presença de 1 µL/mL de Brefeldina A (*Stop Golgi*) (BD Biosciences) preparado em meio RPMI. Após a incubação, as células foram lavadas e incubadas com marcador de viabilidade celular LD por 20 min a 4°C, sob proteção da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão FACS e ressuspensas com o mix de anticorpos de superfície, por 30 min a 4 °C, sob proteção da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão FACS, e ressuspensas em tampão Citofix/Citoperm (BD Biosciences) e incubadas por 20 min a 4 °C, protegidas da luz. Após a fixação, as células foram lavadas com o tampão *Perm Wash* (BD™ Biosciences). O mix de anticorpos intracelulares foi preparado neste mesmo tampão, sendo 30 µL/poço adicionado às amostras, seguido de incubação por 60 min ou *overnight* a 4°C, sob proteção da luz. As células foram lavadas com tampão Perm Wash (BD Biosciences), e com tampão de FACS, e finalmente, ressuspensas em tampão de FACS.

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

Ly6C- SiglecF+); macrófagos (CD11b+ CD64+ F4/80+ Ly6C-); monócitos (CD11b+ CD64- F4/80- Ly6C+); DCs (TCR- β - CD19- SiglecF- Ly6G- Ly6C- CD64- F480- CD11c+ MHCII+ CD103+ ou CD11b+ ou CD103+CD11b+).

A análise das células de origem linfóide (com exceção dos linfócitos B) pode ser vista na figura 2. As *gates* foram feitas a partir da população de células vivas, Live and Dead-CD45+ e Thy1.2+ (CD90.1). Foram caracterizadas ILCs (Thy1.2+ TCR- β -) e células TCR- β positivas (Thy1.2+ TCR- β +). Dentro destas populações, foi analisada a expressão dos seguintes fatores de transcrição celular: Tbet, GATA-3 e ROR γ t. As ILCs foram separadas em: ILC1 (Tbet+ GATA-3- ROR γ t-), ILC2 (Tbet- GATA-3+ ROR γ t-) e ILC3 (Tbet- GATA-3- ROR γ t+). As células TCR- β CD4+ foram caracterizadas como: Th1 (CD8- GATA-3- ROR γ t- FoxP3- Tbet+); Th2 (CD8- GATA-3+ ROR γ t- FoxP3-); Th17 (CD8- GATA-3- FoxP3- Tbet- ROR γ t+ CD44+) e Treg (CD8- GATA-3var FoxP3+). A determinação da produção de citocinas também foi feita dentro da população CD45+ e Thy1.2+ (CD90.1), como observado na figura 3. Dentro das populações de ILCs, TCR- β + e NK (TCR- β - NK1.1+), a produção das seguintes citocinas pode ser analisada: IFN- γ , IL-1- β , IL-17, IL-4, IL-13 e IL-6. Além disso, a ativação celular pode ser observada pela expressão de CD44.

Anticorpos	Fluorocromos	Clones
CD19	FITC	6D5
SiglecF	PE	1RNM44N
F4/80	PE-Cyanine7	BM8
CD103	APC	2E7
MCH II	AF700	M5/114.15.2
TCR- β	AF780	H57-597
CD64	BV421	10.1
CD11b	BV 605	M1/70
CD11b	Biotinilado	M1/70
CD45	BV650	30-F11
CD45	BV421	30-F11
CD11c	BV785	N418
Ly6G	PE-TR	1A8
GATA-3	FITC	L50-823
FoxP3	PE	FJK-16s
ROR γ t	PERCP	B2D
Ki67	PE-Cyanine7	16A8
Tbet	APC	eBio4B10
CD8	AF700	RPA-T8
CD4	BV605	RM4-5

NK1.1	BV650	PK136
Thy1.2	BV785	30-H12
IL-13	AF488	Ebio13a
IL-5	PE	TRFK5
IL-17	PERCP	eBio17B7
IFN- γ	PE-Cyanine7	B27
IL-1 β	APC	NJTEN3
IL-22	AF647	Poly5164
CD44	BV711	IM7

Quadro 1: Clones de anticorpos utilizados para imunofenotipagem das células dos intestinos delgado e grosso, tecido adiposo mesentérico, linfonodo mesentérico e fígado.

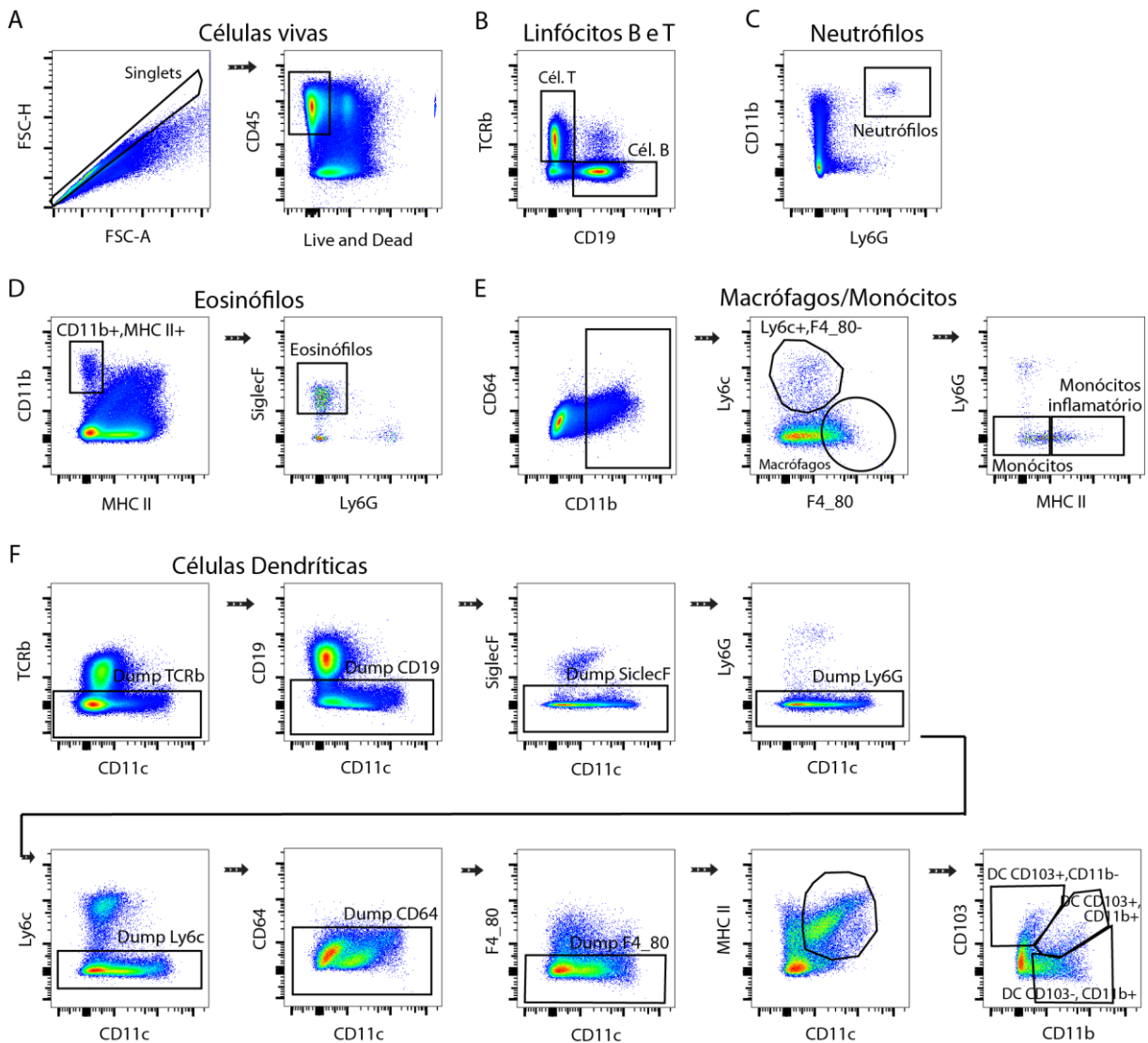


Figura 1- Estratégia de gate utilizada para identificação das populações de células linfoides e mieloides.

(A) As análises foram feitas a partir da população de células vivas, Live and Dead- CD45+. Foram identificadas as seguintes populações: (B) linfócitos T (TCR- β + CD19-); linfócitos B (TCR- β - CD19+); (C) neutrófilos (CD11b+ Ly6G+); (D) eosinófilos (CD11b+ MHC-II- Ly6G- SiglecF+); (E) macrófagos (CD11b+ CD64+ F4/80+ Ly6C-); monócitos (CD11b+ CD64-F4/80- Ly6C+); (F) células dendríticas (TCR- β - CD19- SiglecF- Ly6G-

Ly6C- CD64- F480- CD11c+ MHCII+ CD103+ ou CD11b+ ou CD103+CD11b+). As análises foram feitas com o auxílio do software FlowJo™.

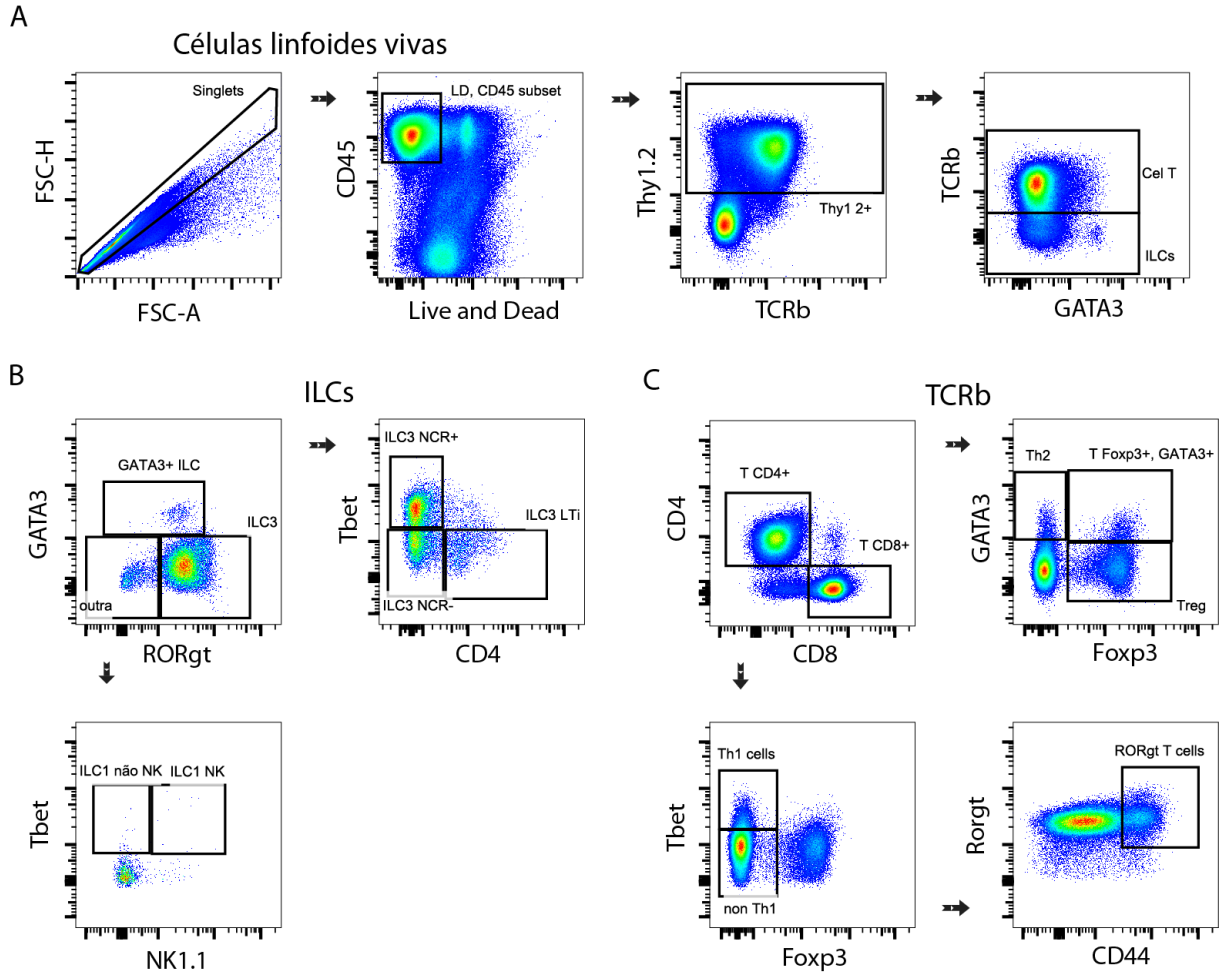


Figura 2- Estratégia de gate utilizada para identificação das populações celulares de origem linfóide.

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

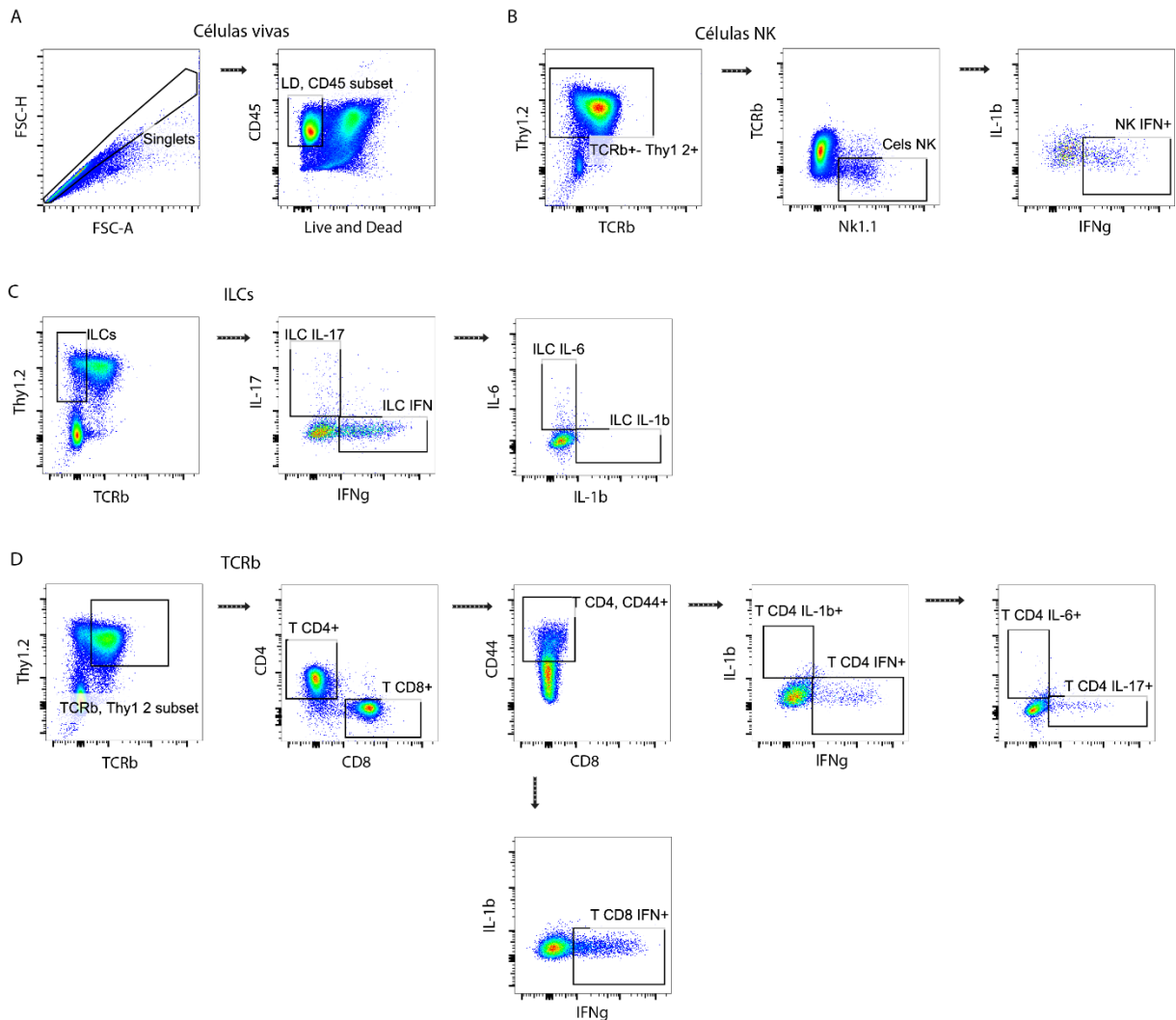


Figura 3 - Estratégia de *gate* utilizada para identificação do perfil de produção de citocinas. (A) A determinação da produção de citocinas também foi feita dentro da população de leucócitos vivos (Live and Dead- CD45+ e Thy1.2+) Dentro das populações de (B) NK (TCR-β- NK1.1+), (C) ILCs e (D) TCR-β+, a produção das seguintes citocinas pode ser analisada: IFN-γ, IL-1-β, IL-17 e IL-6.

3.21 Análise por tSNE – *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*

Para todas as populações celulares, fizemos a caracterização por análise algorítmica de tSNE. Este tipo de análise é capaz de computar os parâmetros derivados da análise e os aproxima por similaridades de marcadores, reduzindo a complexidade dos dados gerados em um gráfico bidimensional. Nas células de origem mieloide, a análise foi realizada dentro dos leucócitos vivos (Live and Dead-, CD45+), enquanto que para fator de transcrição, a análise foi realizada dentro de linfócitos vivos (Live and Dead-, CD45+, Thy1.2+). A partir de leucócitos e linfócitos vivos, respectivamente, realizamos o *DownSample* de modo a garantir que todos os grupos apresentassem o mesmo número de células previamente escolhido. Posteriormente,

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

3.22 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa *GraphPad Prism 7.0*. Os dados foram expressos a partir da média \pm erro padrão da média e os resultados comparados usando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. Para dados não paramétricos, foi realizado o teste T Student, seguido do teste de Mann Whitney. Foram considerados valores estatisticamente significativos aqueles a partir do $p < 0,05$.

4. Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que, as alterações de ganho de peso e de melhora na sensibilidade à insulina observadas pós-infecção por YP estejam relacionadas a alterações na microbiota intestinal induzidas pela infecção. Entretanto, diferente do que hipotetizamos, a contribuição da microbiota para este efeito não é mediada pela produção de SCFA ou sua sinalização via GPR43. Desta forma, buscamos inicialmente compreender e analisar outros aspectos que são modificados pós-infecção por YP e que pudessem estar relacionados a melhora na sensibilidade a insulina.

Para tanto, buscamos induzir a reversão da inflamação no linfonodo mesentérico e a induzir o retorno da resposta imune canônica no MAT a partir da recuperação da reposta de perfil do tipo 2. Entretanto, diferente do que hipotetizamos, a inibição do NLRP3 através do uso da glibenclamida não possibilitou a diminuição do infiltrado inflamatório no linfonodo mesentérico, assim como também não apresentou grande interferência sob a melhora na sensibilidade a insulina. Ademais, concluímos que os animais pós-infecção por YP apresentam resistência ao retorno da resposta imune canônica no MAT, visto que as estratégias utilizadas para tal falharam nesta indução, mesmo sendo capazes de induzir a perda da sensibilidade à insulina adquirida após a infecção por YP.

Em relação a influência dos linfócitos B no MAT sobre a síndrome metabólica não clássica, concluímos que de fato os linfócitos B parecem ter influência na vantagem da melhora da resposta a insulina adquirida após a infecção por YP, já que a ausência destas células está relacionada ao aumento da resistência à insulina.

Além disto, concluímos que as alterações observadas pós-infecção por Yp não estão restritas a “cicatriz imunológica”, a resposta à insulina, e a modificações no tráfego e absorção de lipídeos provenientes da dieta, mas que em última estância estão intimamente relacionadas a predisposição ao desenvolvimento de aterosclerose.

5. Referências bibliográficas

- ARBEENY, C. M. et al. Determinants of the uptake of very low density lipoprotein remnants by the perfused rat liver. **Metabolism**, v. 36, n. 11, p. 1106–1113, 1987.
- ARPAIA, N. et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, v. 504, p. 451–455, 2013.
- BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L.V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101, p.15718–23, 2004.
- BÄCKHED, F.; JONSSON, A. L. Role of gut microbiota in atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 14, p. 79-87, 2016.
- BELKAID, Y.; BOULADOUX, N.; HAND, T. W. Effector and memory T cell responses to commensal bacteria. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 6, p. 299–306, 2013.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. **Cell**, v.157, p. 121-41, 2014.
- BERGMAN, R. N.; KIM, S. P.; CATALANO, K. J. et al. Why Visceral Fat is Bad: Mechanisms of the Metabolic Syndrome. **Obesity**, v. 14, p. 16S-19S, 2006.
- BJORNSTAD, P., ECKEL, R. H. Pathogenesis of Lipid Disorders in Insulin Resistance: a Brief Review. **Current Diabetes Reports**, v. 18, p. 1-8, 2018.
- BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. Microbial Translocation Across the GI Tract. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n.1, p.149–173, 2012.
- BRENCHLEY, J.M.; PRICE, D.A.; SCHACKER, T.W.; ASHER, T.E.; SILVESTRI, G.; RAO, S.; KAZAZ, Z.; BORNSTEIN, E.; LAMBOTTE, O.; ALTMANN, D.; et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat. Med.**, v.12, p.1365–137, 2006.
- BRESTOFF, J. R.; KIM, B. S.; SAENZ, S. A.; STINE, R. R.; MONTICELLI, L. A.; SONNENBERG, G. F.; et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. **Nature**, v. 519, p.242–6, 2015.

BROWN, A. J.; GOLDSWORTHY, S. M.; BARNES, A. A.; EILERT, M. M.; TCHEANG, L.; DANIELS, D.; MUIR, A. I.; WIGGLESWORTH, M. J.; KINGHORN, I.; FRASER, N. J.; PIKE, N. B.; STRUM, J. C.; STEPLEWSKI, K. M.; MURDOCK, P. R.; HOLDER, J. C.; MARSHALL, F. H.; SZEKERES, P. G.; WILSON, S.; IGNAR, D. M.; FOORD, S. M.; WISE, A.; DOWELL, S. J. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. **J Biol Chem.**, v. 278, n.13, p.11312–11319, 2003.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v.232, p.34-47, 1986.

CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M.; KNAUF, C.; BASTELICA, D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; CHABO, C.; WAGET. A.; DELMEE, E.; COUSIN, B.; SULPICE, T.; CHAMONTIN, B.; FERRIERES, J.; TANTI, J. F.; GIBSON, G. R.; CASTEILLA, L.; DELZENNE, N. M.; ALESSI, M. C.; BURCELIN, R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n.7, p.1761–1772, 2007.

CHUNG, K. J.; NATI, M.; CHAVAKIS, T.; CHATZIGEORGIOU, A. Innate Immune cells in the adipose tissue. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 19, p. 283-292, 2018.

DA SILVA-SANTOS, J. E.; SANTOS-SILVA, M. C.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J. The Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in Neutrophil Migration and Plasma Exudation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 3, p. 946–951, 2002.

DEN BESTEN, G.; BLEEKER, A.; GERDING, A.; VAN EUNEN, K.; HAVINGA, R.; VAN DIJK, T.H.; OOSTERVEER, M.H.; JONKER, J.W.; GROEN, A.K.; REIJNGOUD, D.J.; et al. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPARgamma-Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. **Diabetes**, v. 64, p. 2398–2408, 2015.

ELINAV, E.; TILG, H.; ZMORA, N.; ADOLPH, T. E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. **Nat Ver Immunol**, doi: 10.1038/s41577-019-0198-4, 2019.

EPSTEIN SE, et al. Infection and atherosclerosis: Potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p.1417– 1420, 2000.

ESTES, J.D.; HARRIS, L.D.; KLATT, N.R.; TABB, B.; PITTALUGA, S.; PAIARDINI, M.; BARCLAY, G.R.; SMEDLEY, J.; PUNG, R.; OLIVEIRA, K.M.; et al. Damaged intestinal

epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. **PLoS Pathog.**, v. 19, e1001052, 2010.

FONSECA, D. M.; HAND, T. W.; HAN, S.-J.; GERNER, M. Y.; ZARETSKY, A. G.; BYRD, A. L.; HARRISON, O.J.; ORTIZ, A. M.; QUINONES, M.; BRENCHLEY, J. M.; BRODSKY, I. E.; GERMAIN, R. N.; BELKAID, Y. Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. **Cell**, v.163, p.354–366, 2015.

FRANCESCHINI, G. Apolipoprotein function in health and disease: insights from natural mutations. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 26, n. 9, p. 733-746, 1996.

FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, p. 446–450, 2013.

GABORIAU-ROUTHIAU, V.; RAKOTOBE, S.; LE´ CUYER, E.; MULDER, I.; LAN, A.; BRIDONNEAU, C.; ROCHET, V.; PISI, A.; DE PAEPE, M.; BRANDI, G., et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. **Immunity**, v.31, p. 677–689, 2009.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; HAUTEFORT, I.; THOMPSON, A.; HINTON, J.C.; VAN IMMERSSEEL, F. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p.946–949, 2006.

GREGORY, J.C.; BUFFA, J. A.; ORG, E.; WANG, Z.; LEVISON, B. S.; ZHU, W. et al. Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. **J Biol Chem.**, v. 290, n. 9, p. 5647–60, 2015.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HAND, T. W.; VUJKOVIC-CVIJIN, I.; RIDAURA, V. K.; BELKAID, Y. Linking the microbiota, chronic disease, and the immune system. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 12, p. 831–843, 2016.

HAND, T.W.; DOS SANTOS, L.M.; BOULADOUX, N.; MOLLOY, M.J.; PAGÁN, A.J.; PEPPER, M.; MAYNARD, C.L.; ELSON, C.O.; BELKAID, Y. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. **Science**, v. 337, p.1553–1556, 2012.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med.**, v. 352, p.1685–1695, 2005.

HEIMESAAT, M.M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H.K.; DUNAY, I.R.; MOTER, A.; GESCHER, D.M. et al. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 177, p. 8785–8795, 2006.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p. 159–169, 2010.

HOOPER, L.V. et al. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 336, p. 1268–1273, 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, p.860–867, 2006.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Um em cada quatro adultos do país estava obeso em 2019; Atenção Primária foi bem avaliada. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019>>. Acesso em: 16 de nov. de 2020.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; GERARD, R. D.; HAMMER, R. E.; HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest.**, v. 92, p.883, 1993.

IVANOV, I.I.; FRUTOS, R. D. E.L.; MANEL, N.; YOSHINAGA, K.; RIFKIN, D.B.; SARTOR, R.B.; FINLAY, B.B.; LITTMAN, D.R. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. **Cell Host Microbe**, v. 4, p. 337–349, 2008.

JIE, Z.; XIA, H.; ZHONG, S. L. et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. **Nat Commun.**, v. 8, p. 845, 2017.

KAMADA, N.; CHEN, G.Y.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nat. Immunol.**, v. 14, p. 685–690, 2013.

KAMINSKI, D. A.; RANDALL, T. D. Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Cell*, v. 31, p. 384-390, 2010.

KARLSSON, F. H.; FÅK, F.; NOOKAEW, I.; TREMAROLI, V.; FAGERBERG, B.; PETRANOVIC, D.; BÄCKHED, F.; NIELSEN, J. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.*, v. 3, p.1245, 2012.

KHOSRAVI, A.; MAZMANIAN, S.K. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 16, p. 221–227, 2013.

KIM, B.; HYUN, C. K. B-cell-activating factor depletion ameliorates aging-dependent insulin resistance via enhancement of thermogenesis in adipose tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, p. 1-13, 2020.

KITAMURA, D.; ROES, J.; KUHN, R.; RAJEWSKY, K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature*, v. 350, p. 423-6, 1991.

KOETH, R. A.; WANG, Z.; LEVISON, B. S.; BUFFA, J. A.; ORG, E.; SHEEHY, B. T. et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.*, v.19, n. 5, p.576–85, 2013.

KOREN, O.; SPOR, A.; FELIN, J.; FÅK, F.; STOMBAUGH, J.; TREMAROLI, V.; BEHRE, C. J.; KNIGHT, R.; FAGERBERG, B.; LEY, R. E.; BÄCKHED, F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci*, v. 108, p. 4592–4598, 2011.

LARSEN, N.; VOGENSEN, F. K.; VAN DEN BERG, F. W.; NIELSEN, D. S.; ANDREASEN, A. S.; et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, v.5:e9085, 2010.

LE POUL, E. et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.*, v.278, n. 28, p.25481–89, 2003.

LEE, Y. S.; WOLLAN, J.; OLEFSKY, J. M. An Integrated View of Immunometabolism. *Cell*, v. 172, n. 1–2, p. 22-40, 2018.

LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, p.837–848, 2006.

LI, J.; LIN, S.; VANHOUTTE, P. M.; WOO, C. W.; XU, A. Akkermansia Muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe^{-/-}Mice. **Circulation**, v. 133, p. 2434–2446, 2016.

LINDSKOG JONSSON, A.; CAESAR, R.; AKRAMI, R.; REINHARDT, C.; FÅK HÅLLENIUS, F.; BORÉN, J.; BÄCKHED, F. Impact of Gut Microbiota and Diet on the Development of Atherosclerosis in Apoe^{-/-}Mice. **Arterioscler Thromb Vasc. Biol.**, v. 38, p. 2318-2326, 2018.

LU, Y.; FAN, C.; LI, P.; LU, Y.; CHANG, X.; QI, K. Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota. **Sci Rep**. 6:37589, 2016.

LUPP, C.; ROBERTSON, M.L.; WICKHAM, M.E.; SEKIROV, I.; CHAMPION, O.L.; GAYNOR, E.C.; FINLAY, B.B. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell Host Microbe**, v. 16, n.2, p. 119-29, 2007.

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

MANZANO, M, J, A.; ANDRÉS, V.; DORADO, B. Oil Red O hematoxin and eosin staining for quantification of atherosclerosis burden in mouse aorta and aortic root. **Methods Mol Biol**, v. 1339, p. 85-99, 2015.

MATSCHINSKY, F. M. Banting Lecture 1995: a lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v. 45, p. 223-41, 1996.

MATTILA KJ, et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. **BMJ** v. 298, p. 779–781, 1989.

MAZMANIAN, S.K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, v.122, p.107–118, 2005.

MIRANDA, M. C. G., OLIVEIRA, R. P., TORRES, L., AGUIAR, S. L. F., PINHEIRO-ROSA, N., LEMOS, L., GUIMARÃES, M. A., REIS, D., SILVEIRA, T., FERREIRA, E., MOREIRA,

T. G., CARA, D. C., MAIOLI, T. U., KELSALL, B. L., CARLOS, D., FARIA, A. M. C. Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. **J Leukoc Biol**, v. 106, p. 513-529, 2019.

MOLOFSKY, A. B.; NUSSBAUM, J. C.; LIANG, H. E.; VAN DYKEN, S. J.; CHENG, L. E.; MOHAPATRA, A. et al. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. **J Exp Med.**, v. 210, p. 535–49, 2013.

MORO, K.; YAMADA, T.; TANABE, M.; TAKEUCHI, T.; IKAWA, T.; KAWAMOTO, H.; et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. **Nature**, v.463, p. 540–4, 2010.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667-85, 2014.

MUCIDA, D.; KUTCHUKHIDZE, N.; ERAZO, A.; RUSSO, M.; LAFAILLE, J.J.; CUROTTO DE LAFAILLE, M.A. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **J. Clin. Invest.**, v.115, p.1923–1933, 2005.

NAKAMURA, T.; FURUHASHI, M.; LI, P.; CAO, H.; TUNCMAN, G. et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. **Cell**, v.140, p. 338–48, 2010.

NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A. S.; RAINES, E. W.; BRESLOW, J. L.; ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 14, p.133-40, 1994.

NAVAB, M. et al. HDL and cardiovascular disease: Atherogenic and atheroprotective mechanisms. **Nature Reviews Cardiology**, v. 8, n. 4, p. 222–232, 2011.

NEAL, M. D.; LEAPHART, C.; LEVY, R.; PRINCE, J.; BILLIAR, T. R.; WATKINS, S.; LI, J.; CETIN, S.; FORD, H.; SCHREIBER, A.; HACKAM, D. J. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. **J Immunol**, v. 176, p. 3070–3079, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª ed. Brazil: Artmed, 2013.

- ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Type 2 responses at the interface between immunity and fat metabolism. **Curr Opin Immunol.**, v. 36, p. 67– 72, 2015.
- OREKHOV, A. N.; BOBRY SHEV, Y.V.; SOBENIN, I.A.; MELNICHENKO, A. A.; CHISTI AKOV, D. A. Modified low density lipoprotein and lipoprotein-containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease. **Int J Mol Sci.**, v.15, n. 7, p.12807-41, 2014.
- OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.
- PENTIKAINEN, M. O.; OORNI, K.; ALA-KORPELA, M., KOVANEN, P. T. Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. **Journal of Internal Medicine**, v.247, n.3, p.359–370, 2000.
- PIEDRAHITA, J. A.; ZHANG, S. H.; HAGAMAN, J. R.; OLIVER, P. M.; MAEDA, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, p. 4471-5, 1992.
- PLUMP, A. S.; SMITH, J. D.; HAYEK, T.; AALTO SETÄLÄ, K.; WALSH, A.; VERSTUYFT, J. G.; RUBIN, E. M.; BRESLOW, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, p. 343 353, 1992.
- POMPERMAYER, K., AMARAL, F. A., FAGUNDES, C. T., VIEIRA, A. T., CUNHA, F. Q., TEIXEIRA, M. M., SOUZA, D. G. Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 556, p. 215–222, 2007.
- PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Is the beta cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? **Diabetes**, v. 45, p. 273-83, 1996.
- REIKVAN, D.H. et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects of gut mucosa and epithelial gene expression. **Plos One**, v.6, n.3, 2011.
- RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; CHENG, J.; DUNCAN, A. E.; KAU, A. L.; et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. **Science**, v. 341, p. 1079-1089, 2013.

SAIKKU P, et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. **Ann Intern Med.**, v.116, p.273–278, 1992.

SAMSON, S. L.; GARBER, A. J. Metabolic Syndrome. **Endocrinol Metab Clin N Am**, v. 43, p1-23, 2014.

SANDERS, L. M. Carbohydrate: Digestion, Absorption and Metabolism. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 643–650, 2016.

SCHUH, J.; FAIRCLOUGH, G. F.; HASCHEMEYER, R. H. Oxygen-mediated heterogeneity of apo-low-density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 75, n.7, p. 3173-7, 1978.

SIMARD, J. M., GENG, Z., WOO, S. K., IVANOVA, S., TOSUN, C., MELNICHENKO, L., GERZANICH, V. Glibenclamide Reduces Inflammation, Vasogenic Edema, and Caspase-3 Activation after Subarachnoid Hemorrhage. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 29, n. 2, p. 317–330, 2008.

SMITH, P. M. et al. The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. **Science**, v.341, p. 569–573, 2013.

SOKOL, H.; SEKSIK, P.; FURET, J. P.; FIRMESSE, O.; NION-LARMURIER, I.; BEAUGERIE, L.; COSNES, J.; CORTHER, G.; MARTEAU, P.; DORÉ, J. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 15, p.1183–1189, 2009.

SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. **FASEB J.**, v. 24, p. 2596–611, 2010.

STEINBRECHER, U. P.; FISHER, M.; WITZTUM, J.L.; CURTISS, L. K. Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, acetylation, or carbamylation: generation of antibodies specific for derivatized lysine. **J Lipid Res.**, v. 25, n. 10, p.1109-16, 1984.

TABAS, I.; LICHTMAN, A. H. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. **Immunity**, v. 47, n. 4, p. 621–634, 2017.

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BORÉN, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1832–1844, 2007.

- TANG, W. H.; WANG, Z.; LEVISON, B. S.; KOETH, R. A.; BRITT, E. B.; FU, X. et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. **N Engl J Med.**, v.368, n.17, p.1575–84, 2013.
- TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027–1031, 2006.
- TURNBAUGH, P.J.; BACKHED, F.; FULTON, L.; GORDON, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell Host Microbe**, v.3, p. 213–23, 2008.
- TUROVSKIY, Y.; SUTYAK NOLL, K.; CHIKINDAS, M.L. The etiology of bacterial vaginosis. **J. Appl. Microbiol.** v. 110, p.1105–1128, 2011.
- VAN DER WAAIJ, D.; BERGHUIS-DE VRIES, J.M.; LEKKERKERK LEKKERKERK-V. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. **J. Hyg. (Lond.)**, v. 69, p. 405–411, 1971.
- VÉNIANT, M. M.; WITHYCOMBE, S.; YOUNG, S. G. Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 21, p.1567–70, 2001.
- VERNOCCHI, P.; CHERICO, F. D.; PUTIGNANI, L. Gut Microbiota Metabolism and Interaction with Food Components. **Int J Mol Sci**, v. 21, p. 3688, 2020.
- VREUGDENHIL, A. C.; ROUSSEAU, C. H.; HARTUNG, T.; GREVE, J. W.; VAN 'T VEER, C.; BUURMAN, W. A. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. **J Immunol.**, v.170, p.1399–1405, 2003.
- WALKER, A. W.; SANDERSON, J. D.; CHURCHER, C.; PARKES, G. C.; HUDSPITH, B. N.; et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. **BMC Microbiol.**, v.11, 2010.
- WANG, Z.; TANG, W. H.; BUFFA, J. A.; FU, X.; BRITT, E. B.; KOETH, R. A. et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. **Eur Heart J.**, v. 35, n.14, p.904–10, 2014.

WEITKUNAT K, STUHLMANN C, POSTEL A, et al. Short-chain fatty acids and inulin, but not guar gum, prevent diet-induced obesity and insulin resistance through differential mechanisms in mice. **Sci Rep.** 7(1):6109, 2017.

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

WHO (World Health Organization). Cardiovascular Diseases (CVDs). World Health Organization, 2017. Disponível em: < [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 23 de nov. de 2020.

WHO (World Health Organization). Obesity and overweight. World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 16 de nov. de 2020.

WICK, G.; SCHETT, G.; AMBERGER, A.; KLEINDIENST, R.; XU, Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? **Immunol Today**, v. 16, p. 27- 33, 1995.

WORBS, T.; BODE, U.; YAN, S.; HOFFMANN, M.W.; HINTZEN, G.; BERNHARDT, G.; FÖRSTER, R.; PABST, O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v.203, p.519–527, 2006.

WRIGHT, S. D.; RAMOS, R. A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, p.1431–1433, 1990.

WU, D.; MOLOFSKY, A. B.; LIANG, H. E.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; JOUIHAN, H. A.; BANDO, J. K.; et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 332, p. 243–7, 2011.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v.112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

ZATTERALE, F.; LONGO M.; NADERI, J.; RACITI, G. A.; DESIDERIO, A.; MIELE, C.; BEGUINOT, F. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Front. Physiol.**, v.10, n.1607, p. 1-49, 2019.

ZHANG, G.; LIN, X.; ZHANG, S.; XIU, H.; PAN, C.; CUI, W. A Protective Role of Glibenclamide in Inflammation-Associated Injury. **Mediators of Inflammation**, p. 1–11, 2017.

ZHANG, S. H.; REDDICK, R. L.; PIEDRAHITA, J.A.; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science**, v. 258, p.468–71, 1992.