



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

RENAN OLIVEIRA CORRÊA

**PARTICIPAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA
CURTA E SEU RECEPTOR (FFAR2) NA RESPOSTA
IMUNE EM MODELO DE MONOINFECÇÃO POR
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

**CAMPINAS
2017**

RENAN OLIVEIRA CORRÊA

**PARTICIPAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA
CURTA E SEU RECEPTOR (FFAR2) NA RESPOSTA
IMUNE EM MODELO DE MONOINFECÇÃO POR
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na Área de Imunologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO RENAN
OLIVEIRA CORRÊA E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCO AURÉLIO RAMIREZ
VINOLO

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo

CAMPINAS
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/02560-6; FAPESP, 2012/10653-9

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3333-0482>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C817p Corrêa, Renan Oliveira, 1989-
Participação dos ácidos graxos de cadeia curta e seu receptor (FFAR2) na resposta imune em modelo de monoinfecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* / Renan Oliveira Corrêa. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marco Aurélio Ramirez Vinolo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neutrófilos. 2. Bactérias anaeróbias. 3. FFAR2. 4. Fagocitose. 5. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. I. Vinolo, Marco Aurélio Ramirez, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Participation of short chain fatty acids and their receptor (FFAR2) in the immune response to a monoinfection model of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Palavras-chave em inglês:

Neutrophils

Anaerobic bacteria

FFAR2

Phagocytosis

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marco Aurélio Ramirez Vinolo [Orientador]

José Luiz Proença Modena

Tarcília Aparecida da Silva

Data de defesa: 30-01-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 30 de Janeiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Prof. Dr. José Luiz Proença Modena

Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva

Os membros da Comissão Examinadora acima listados assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edmilson e Ligia, em troca de todo o carinho, todo o esforço, todas as orações e todo o apoio. Ao nosso amor incondicional e etéreo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me agraciar com todas as ferramentas necessárias à realização deste trabalho, e por se fazer presente nos pequenos e singelos detalhes de cada dia.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em meu potencial, me dando total liberdade de escolha pessoal e profissional. Serei eternamente grato por toda a confiança em mim depositada, mesmo quando a simplicidade de vida não permitia a vocês entenderem em plenitude o significado dos rumos muitas vezes tomados. O meu mais profundo obrigado!

Ao Rafael Andrade, amigo de longa data, que acompanhou de perto toda a trajetória, desde o início da graduação até este momento, e sem o qual grande parte deste trabalho estaria formatado de maneira muito mais amadora.

À UNICAMP, meu segundo lar, que me proporcionou e proporciona experiências que vão infinitamente além dos meus maiores e mais ambiciosos sonhos!

À FAPESP, agência fomentadora deste projeto.

Ao Professor Doutor Marco Aurélio Vinolo, por me receber em seu laboratório como um de seus primeiros alunos. Devo muito a você pelo imenso progresso pessoal e profissional que obtive neste tempo de trabalho em conjunto.

Ao Prof. Dr. Hernandes F. de Carvalho (IB/UNICAMP), ao Dr. Patrick Varga-Weisz (University of Cambridge/UK), à Profa. Dra. Rita Rio (West Virginia University/EUA), ao Prof. Dr. John Mansfield e à Dra. Julia Gilden (University of Wisconsin – Madison/EUA), todos por me orientarem de maneira louvável ao longo da minha vida acadêmica.

Aos amigos Simone Giatti, Miguel Paiva, Gabriel Benencase, Lucas Politano e Rafael Bonaldo por todos os finais de semana da última década!

Aos amigos de laboratório e departamento, em especial à Aline Vieira e Érica Sernaglia, sem as quais este trabalho não estaria finalizado.

A todos os amigos dos mais diferentes vínculos. Tenham a certeza que cada um de vocês ajudou a moldar a pessoa que hoje sou.

Aos amigos de diferentes partes do mundo que se tornaram uma segunda família nos momentos de maior necessidade afetiva. Carrego todos em meu coração, e para sempre viverei com esta saudade.

A todos os professores que tive, do pré à pós, os verdadeiros heróis nacionais.

E à toda a minha família, alicerce da minha história!

EPÍGRAFE

*"Two roads diverged in a yellow wood,
And sorry I could not travel both
And be one traveler, long I stood
(...)
I shall be telling this with a sigh
Somewhere ages and ages hence:
Two roads diverged in a wood, and I—
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference."*

Robert Frost – 'The Road Not Taken'

RESUMO

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), acetato, propionato e butirato, são produtos finais oriundos do metabolismo bacteriano. Além de serem um importante substrato energético às células epiteliais intestinais, estes metabólitos são capazes de modular a ativação do sistema imune e, com isso, parecem exercer um papel importante na manutenção da homeostase do hospedeiro. Um dos principais mecanismos associados aos efeitos dos AGCCs é a ativação de receptores acoplados à proteína G, incluindo o FFAR2, receptor de membrana altamente expresso em neutrófilos. Embora se saiba que as bactérias anaeróbias são capazes de produzir altas quantidades de AGCCs em locais de infecção, os efeitos ocasionados por esta produção local e a ativação de FFAR2 ainda são incertos. Dessa maneira, este trabalho se propôs a investigar os efeitos dos AGCCs, produzidos localmente nos sítios de infecção, na resposta imunológica contra a bactéria patogênica *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Para isso, utilizamos modelo de câmara subcutânea em camundongos C57BL/6 para iniciar e manter uma monoinfecção isolada de Aa no interior do organismo dos animais. Os AGCCs inoculados juntamente com a bactéria na câmara não alteraram o padrão de migração leucocitária ao local da infecção, mas reduziram a capacidade das células em fagocitar e destruir as bactérias ali presentes, além de terem modulado negativamente a produção de citocinas e quimiocinas (TNF- α , IL-10 e Cxcl2) essenciais para orquestrar toda a resposta imune subsequente. Tais efeitos não decorreram de ações diretas dos AGCCs sobre o crescimento bacteriano ou de efeito citotóxico dos AGCCs sobre os leucócitos. *In vitro*, observamos que a incubação com AGCCs reduziu a capacidade de fagocitose e produção de TNF- α por neutrófilos humanos. Por fim, demonstramos ainda que o receptor FFAR2 é importante na resposta à infecção por Aa, uma vez que na sua ausência, houve uma redução na capacidade de eliminação dessa bactéria. Em suma, estes resultados indicam que a produção de AGCCs no local da infecção interfere com a ação dos neutrófilos e com isso pode contribuir para o início ou progressão do quadro infeccioso.

ABSTRACT

Short chain fatty acid (SCFAs), acetate, propionate and butyrate, are end products derived from bacterial metabolism. They are not only an important energetic substrate to the intestinal epithelial cells, but they are also capable of modulating the activation of the immune system, thereby helping to maintain the host homeostasis. One of the main mechanisms associated with the effects of the SCFAs is the activation of G protein-coupled receptors, including the FFAR2, a surface receptor highly expressed on neutrophils. Although it is already known that anaerobic bacteria are capable of producing high amounts of SCFAs at their infectious sites, the effects of this local production are still unclear. Thus, this study aimed to investigate the effects of these SCFAs, locally produced at the infectious sites, in the immune response against the pathogenic bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). For that, we have used a subcutaneous chamber model in C57BL/6 mice to initiate and maintain a monoinfection of Aa inside the organism of the animals. The SCFAs, inoculated together with the bacteria inside of the chamber, did not alter the pattern of leukocytes migration to the infectious site, but they reduced the capacity of the migrating cells to phagocytose and to destroy the bacteria, decreasing, as well, the production of certain cytokines and chemokines (TNF- α , IL-10 and Cxcl2) that are essential to orchestrate the subsequent immune response. These effects were not caused by direct actions of the SCFAs in the bacterial growth or their cytotoxic effects on leukocytes. *In vitro*, we have seen that incubation with SCFAs reduced the phagocytic capacity and the production of TNF- α by human neutrophils. Lastly, we have also demonstrated that the FFAR2 receptor is important for the response to Aa infection, since that in its absence, there was a reduction in the capacity to eliminate this bacterium. Altogether, these results indicate that the production of the SCFAs in the infectious site interferes with neutrophils actions and with that, it can contribute to the start and progression of the infectious disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vias de atuação dos ácidos graxos de cadeia curta e seus principais efeitos celulares. A ligação destes metabólitos aos receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCRs), principalmente FFAR2, FFAR3, GPR109a e Olfr78, desencadeia diversas sinalizações intracelulares que levarão às diferentes respostas celulares. Além disso, os AGCCs são ainda capazes de modificar as respostas celulares ao atuarem diretamente no núcleo ativando as histonas acetil-transferases (HATs) ou principalmente inibindo as histonas deacetilases (HDACs), enzimas que controlam a acessibilidade dos fatores de transcrição ao material genético (imagem retirada de CORRÊA *et al.*, 2016).....22

Figura 2. Morfologia da câmara subcutânea, fora do corpo do animal, 12 dias após ser implantada. Notar que a bobina de metal se encontra totalmente coberta por um tecido epitelial vascularizado. Além disso, mesmo ao final dos doze dias, a câmara ainda mantém seu formato original, não sofrendo deformidades. Tamanho da câmara: 1,0cm de comprimento x 0,5cm de diâmetro.....30

Figura 3: Recrutamento leucocitário para o interior da câmara subcutânea quatro horas após a inoculação de PBS ou PBS acrescido de um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato e 2,5 mM butirato). N = 6 animais (Grupo PBS) e 9 animais (Grupo PBS + AGCCs), divididos em três experimentos distintos. Os dados de ambos são a média $\pm$ SEM e foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$37

Figura 4: Recrutamento leucocitário para o interior da câmara subcutânea (A) 4 horas ou (B) 24 horas após a inoculação de Aa acrescida ou não de um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato). Nos gráficos, cada quadrado ou triângulo representa um animal de cinco experimentos distintos. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 10-18 animais por grupo). A linha tracejada representa a média do grupo controle negativo (inoculado apenas com PBS, sem bactéria). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. (C) Perfil da migração de leucócitos ao longo do tempo, mostrando a média do total de células, bem como de neutrófilos e células mononucleadas recrutados para o interior da câmara após inoculação de Aa.....39

Figura 5: Exemplo de placa ágar BHI chocolate plaquada com três diferentes diluições do exsudato inflamatório da câmara subcutânea mostrando o crescimento bacteriano (UFCs) após cinco dias de cultura, em anaerobiose, à 37°C. (A) diluição 1:10; (B) diluição 1:1000; (C) diluição 1:10.000. Cada círculo (gota) representa uma replicata, sendo cinco replicatas por diluição; um animal por placa.....40

Figura 6: Análise da sobrevivência das bactérias na câmara subcutânea. O exsudato inflamatório foi diluído, plaqueado em ágar BHI chocolate suplementado, mantido em anaerobiose, à 37°C, por 3-5 dias, para determinação do número de UFCs. Os valores obtidos foram posteriormente normalizados pelos valores obtidos no grupo controle (Aa). Nos gráficos, cada quadrado ou triângulo representa um animal de cinco experimentos distintos. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 7-12 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. 'AGCCs' representa um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato).....41

Figura 7: Análise de viabilidade celular na presença dos ácidos graxos de cadeia curta. O exsudato inflamatório foi coletado do interior da câmara quatro horas após inoculação da bactéria isoladas (A) ou crescidas com um mix de AGCCs (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato) (B). As células foram marcadas com o anticorpo anti-Ly6G-PE, bem como com Anexina V-FITC e 7-AAD para posterior análise em citometria de fluxo. N = 4 animais. O primeiro *gate* foi delimitado com base na população celular com tamanho maior. Já o segundo *gate* foi delimitado na população de células Ly6G-PE positivas (neutrófilos). Assim, o terceiro gráfico nos mostra a porcentagem de células viáveis (população negativa para 7-AAD e Anexina V-FITC).....42

Figura 8: Análise do crescimento bacteriano na presença dos ácidos graxos de cadeia curta. (A) A bactéria Aa foi cultivada em caldo BHI líquido, na presença ou ausência os AGCCs, por 24 horas. Controle: PBS; Ac: acetato 26 mM; Pr: propionato 10 mM; Bt: butirato 2,5 mM. CN representa o controle negativo, isto é, caldo BHI líquido sem a bactéria. Os resultados representam a média da densidade ótica (D.O.) de dois experimentos distintos, com N = 12-14 amostras por grupo. (B) A bactéria foi incubada, por 24 horas, em caldo BHI líquido com ou sem a adição de um mix de AGCCs (nas mesmas concentrações anteriores), sendo

posteriormente plaqueadas para contagem das UFCs. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM, e representam os resultados de dois experimentos distintos.....43

Figura 9: Análise da capacidade dos neutrófilos (células Ly6G⁺) que migram para o interior da câmara em fagocitar as bactérias (marcadas com sonda pHrodo) inoculadas. Experimento realizado no tempo de 4 horas após inoculação. No gráfico A, cada quadrado ou triângulo representa um animal. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 6-8 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. Em B, figura representativa da citometria de fluxo mostrando a porcentagem de neutrófilos que fagocitou as bactérias. ‘AGCCs’ representa um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato).....44

Figura 10: Análise da capacidade *in vitro* dos neutrófilos humanos em fagocitar as bactérias (opsonizadas e marcadas com sonda pHrodo), no tempo de duas horas. Resultados obtidos após análise por citometria de fluxo. N = 5 amostras. Os resultados foram normalizados pelo valor do grupo controle Aa (sem AGCCs) e são apresentados como média $\pm$ SEM. Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. ‘AGCCs’ representa um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato).....45

Figura 11: Análise da produção de mediadores inflamatórios pelas células imunes no interior da câmara subcutânea. As concentrações das citocinas e quimicinas no exsudato inflamatório da câmara subcutânea foram medidas pelo método de ELISA, 4 e 24 horas após inoculação da bactéria Aa acrescida ou não do mix dos AGCCs (26 mM acetato, 10 mM propionato e 2,5 mM butirato). N = 7-12 animais para o tempo de 4 horas e de 10-18 animais para o tempo de 24 horas. Resultados apresentados como média $\pm$ SEM e analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$47

Figura 12: Análise da modulação da produção de TNF- α pelos ácidos graxos de cadeia curta em neutrófilos humanos *in vitro*. As células foram mantidas em cultura por 6 horas, na presença de Aa com ou sem o mix dos AGCCs (26 mM acetato, 10 mM propionato e 2,5 mM butirato). Há ainda outros grupos em que as células foram incubadas com Aa na presença de diferentes diluições deste mix dos AGCCs. N = 5 amostras para cada grupo. Resultados apresentados

como média $\pm$ SEM e analisados pelo teste de Tukey, com significância considerada para $p < 0,05$ (***) para $p < 0.001$ e **** para $p < 0.0001$).....48

Figura 13: Recrutamento leucocitário para o interior da câmara subcutânea 24 horas após a inoculação de Aa nos animais FFAR2^{+/+} ou FFAR2^{-/-}. (A) Cada círculo ou quadrado representa um animal de quatro experimentos distintos. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 12-13 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. (B) Perfil da migração de leucócitos no tempo de 24 horas, mostrando a média de migração de cada tempo de cada grupo, bem como diferenciado os dois tipos celulares predominantes (neutrófilos e células mononucleadas).....49

Figura 14: Análise da sobrevivência das bactérias na câmara subcutânea. O exsudato inflamatório foi diluído, plaqueado em ágar BHI chocolate, mantido em anaerobiose, à 37°C, por 3-5 dias, para determinação do número de UFCs. Os valores foram posteriormente normalizados pelos valores obtidos nos animais FFAR2^{+/+}. Nos gráficos, cada círculo ou quadrado representa um animal de quatro experimentos distintos. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 13-14 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$50

Figura 15: Análise da produção de mediadores inflamatórios pelas células imunes no interior da câmara subcutânea. As concentrações no exsudato inflamatório da câmara subcutânea foram medidas pelo método de ELISA, 24 horas após inoculação da bactéria. N = 5–8 animais. Resultados apresentados como média $\pm$ SEM e analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$51

ANEXO I.....72

ANEXO II.....74

ANEXO III.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrão de migração leucocitária no tempo de 4 horas.....	38
Tabela 2 – Padrão de migração leucocitária no tempo de 24 horas.....	38
Tabela 3 – Padrão de migração leucocitária no tempo de 72 horas.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs: Ácidos graxos de cadeia curta
SCFAs: <i>Short chain fatty acids</i>
FFAR2: <i>Free-fatty acid receptor 2</i>
GPR43: <i>G-protein coupled receptor 43</i>
Aa: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
GPCRs: Receptores acoplados à proteína G
FFAR3: <i>Free-fatty acid receptor 3</i>
GPR41: <i>G-protein coupled receptor 41</i>
GPR109a: <i>G-protein coupled receptor 109a</i>
HCA2: <i>Hydroxycarboxylic acid receptor 2</i>
Olf8: <i>Olfactory receptor 8</i>
HDACs: Histonas deacetilases
HATs: Histonas acetiltransferases
KO: <i>knockout/nocaute</i>
LPS: lipopolissacarídeo
Treg: Linfócitos T reguladores
LtxA: Leucotoxina
LFA-1: <i>leukocyte function antigen-1</i>
BHI: Infusão cérebro-coração
UFCs: Unidades formadoras de colônias
PBS: Tampão fosfato-salino
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
TNF- α : Fator de necrose tumoral α
IL-1 β : Interleucina 1 β
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-18: Interleucina 18

Cxcl1: (<i>C-X-C Motif</i>) chemokine ligand 1
Cxcl2: (<i>C-X-C motif</i>) chemokine ligand 2
ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática
Ac: Acetato
Bt: Butirato
Pr: Propionato
NH ₄ Cl: Cloreto de amônio
NaHCO ₃ : Bicarbonato de sódio
MOI: <i>Multiplicity of infection</i>
CN: Controle negativo
SEM: <i>Standard error of the mean</i>
FFAR2 ^{+/+} : <i>Free-fatty acid receptor 2 wild-type</i>
FFAR2 ^{-/-} : <i>Free-fatty acid receptor 2 knockout</i>
fMLP: Peptídeo formil-Met-Leu-Phe
TLR2: Receptor do tipo Toll 2
TLR4: Receptor do tipo Toll 4
NF-κB: Fator nuclear kappa B
IECs: Células epiteliais intestinais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVO.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Bactérias.....	29
3.3 Implantação da câmara subcutânea	30
3.4 Infecção com <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	31
3.5 Concentração utilizada dos ácidos graxos de cadeia curta	31
3.6 Coleta e análise do material	31
3.6.1 Análise de mediadores inflamatórios	32
3.6.2 Análise quali- e quantitativa de leucócitos	32
3.6.3 Análise da capacidade de <i>killing</i> das células imunes	32
3.7 Análise da capacidade de fagocitose das células imunes	33
3.8 Análise da viabilidade celular	33
3.9 Curva de crescimento da Aa	33
3.10 Experimentos com neutrófilos humanos	34
3.11 Análise dos resultados	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Recrutamento leucocitário para o local de infecção	36
4.2 Modulação na capacidade fagocítica dos neutrófilos	39
4.3 Modulação na produção de mediadores inflamatórios	45
4.4 Análises em camundongos FFAR2 ^{-/-}	46
4.4.1 Recrutamento leucocitário para o local de infecção	48
4.4.2 Alteração na sobrevivência das bactérias	49
4.4.3 Modulação na produção de mediadores inflamatórios	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS.....	61
8. ANEXO I	72

9. ANEXO II.....	74
10. ANEXO III.....	75

1. INTRODUÇÃO

Todos os animais apresentam relação simbiótica com micro-organismos, sendo estes parcialmente responsáveis pelo sucesso evolutivo e irradiação desse reino. Em seres humanos, estima-se que o número de células microbianas ultrapasse de duas a dez vezes o número de nossas próprias células, indicando assim uma importante interação biológica interespecífica (BÄCKHED *et al.*, 2005; SENDER *et al.*, 2016). A grande maioria destes micro-organismos se localiza em nosso trato digestório. SEKIROV *et al.*, (2010) nos revelam que o número de bactérias aumenta exponencialmente conforme avançamos no trato gastrointestinal, com cerca de 10^1 bactérias/grama no estômago, 10^3 no duodeno, 10^7 no íleo e incríveis 10^{12} no cólon. Esta microbiota atua ao longo de toda a vida na regulação da homeostase do hospedeiro, moldando e auxiliando em diversas funções fisiológicas como na absorção de nutrientes e no metabolismo, no desenvolvimento do sistema imunológico e na proteção contra agentes patogênicos (HOOPER *et al.*, 2002; MAYNARD *et al.*, 2012; BRESTOFF *et al.*, 2013; PURCHIARONI *et al.*, 2013; SOMMER *et al.*, 2013). De fato, estudos nos mostram que alterações quali- ou quantitativas desta microbiota (processo denominado de disbiose) estão associadas com o desenvolvimento de diversas patologias incluindo doenças inflamatórias intestinais, câncer de cólon, diabetes mellitus tipo I e II, artrite reumatoide, periodontite, asma e até mesmo obesidade (ROUND *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) são importantes produtos metabólicos oriundos desta microbiota. Encontrados em altas concentrações principalmente no cólon (70 – 140 mM), mas também na cavidade oral (1 - 38 mM) e no trato genital feminino (120 mM) (WONG *et al.*, 2006; MIRMONSEF *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2014), estes ácidos carboxílicos são produzidos majoritariamente como produtos finais da fermentação das fibras alimentares por bactérias anaeróbias incluindo componentes dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* presentes no intestino. Os AGCCs mais abundantes em nosso organismo são o ácido acético (C2), ácido propiônico (C3) e ácido butírico (C4), sendo normalmente encontrados em suas formas desprotonadas (acetato, propionato e butirato) (WONG *et al.*, 2006). A composição das espécies

bacterianas, bem como a disponibilidade de substrato, são alguns dos fatores que podem alterar as vias de produção dos AGCCs. No entanto, de maneira geral, os AGCCs são produzidos pelas vias da glicólise (rota de Embden-Meyerhof-Parnas) e da pentose (TAN *et al.*, 2014; KOH *et al.*, 2016). Neste contexto, o acetato é derivado principalmente da hidrólise de acetil-CoA (oriundo do piruvato), o butirato é derivado do butiril-CoA (estrutura formada pela junção de duas moléculas de acetil-CoA), enquanto o propionato deriva principalmente do succinato (molécula oriunda do piruvato) (LOUIS *et al.*, 2014; KOH *et al.*, 2016).

Como já bem estabelecido na literatura, após ser produzido, o butirato é preferencialmente utilizado pelos colonócitos como fonte energética, enquanto o acetato e o propionato são direcionados ao fígado via sistema porta hepático. O propionato é utilizado principalmente pelos hepatócitos, enquanto o acetato chega em altas concentrações na corrente sanguínea, sendo metabolizado pelos tecidos periféricos do organismo (POMARE, BRANCH & CUMMINGS, 1985). De fato, estudos nos mostram que a concentração plasmática dos AGCCs é muito baixa, com o acetato variando entre 60 - 150 μM , propionato entre 3 - 7 μM e butirato entre 1 - 4 μM (WOLEVER *et al.*, 2002; VOGT *et al.*, 2004).

O papel dos AGCCs como combustível das células epiteliais já é bastante conhecido. Não apenas 70% - 90% da energia das células epiteliais intestinais provem dos AGCCs, como também cerca de 5 a 10% de toda a demanda energética do nosso organismo é oriunda destes metabólitos (MCNEIL, 1984; SUZUKI *et al.*, 2008). Além disso, ações na regulação do crescimento celular, diferenciação, proliferação e apoptose já foram descritas (MILLARD *et al.*, 2002; RABELO *et al.*, 2003; HOSSAIN *et al.*, 2006). Mais recentemente, novos estudos os têm relacionado com o recrutamento de leucócitos e modificações funcionais dos mesmos, influenciando na diferenciação, ativação e sobrevivência dessas células (revisado por CORRÊA *et al.*, 2016). Diversos trabalhos têm sugerido um papel destes compostos na manutenção da tolerância no trato digestório, além de indicarem a aplicação destes metabólitos e/ou de seus derivados para o tratamento de condições inflamatórias (MASLOWSKI *et al.*, 2009; VINOLO *et al.*, 2009a; VINOLO *et al.*, 2011b; TAN *et al.*, 2016).

Os ácidos graxos de cadeia curta atuam através de dois principais mecanismos de ação, conforme ilustrado na figura 1. O primeiro mecanismo se dá pela ligação

destes metabólitos com receptores acoplados à proteína G (GPCRs) presentes na membrana celular. Uma vez feita a ligação com seus ligantes, tais receptores passam por mudanças conformacionais, ativando a proteína G. A proteína G é uma proteína heterotrimérica formada pelas subunidades α , β e γ que, quando ativada, libera as unidades α e $\beta\gamma$. Estas, por sua vez, irão regular a atividade de enzimas citoplasmáticas, desencadeando diversas sinalizações intracelulares (KATRITCH *et al.*, 2013). Dentre os principais GPCRs ativados por AGCCs podemos citar o GPR43 (atualmente denominado de *free fatty acid receptor 2* – FFAR2), GPR41 (ou *free fatty acid receptor 3* – FFAR3), GPR109a (ou HCA2) e Olfr8 (*olfactory receptor 8*). Tais receptores são encontrados em diferentes tipos celulares (células epiteliais intestinais, células mielóides, linfócitos, adipócitos, entre outros), além de possuírem afinidades distintas pelos AGCCs: FFAR2 (acetato = propionato > butirato); FFAR3 (propionato = butirato > acetato); GPR109a (butirato) e Olfr8 (propionato = acetato) (BROWN *et al.*, 2003; LE POUL *et al.*, 2003; PLUZNICK *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2014). A ativação desses receptores tem sido associada aos diversos efeitos dos AGCCs incluindo suas ações sobre a quimiotaxia, produção de mediadores inflamatórios e diferenciação de células T (MASLOWSKI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2013).

O segundo mecanismo de ação dos AGCCs se dá pela inibição direta das histonas deacetilases (HDACs) e/ou ativação das histonas acetil-transferases (HATs) após adentrarem nas células. As HDACs são divididas em quatro classes (revisado por TAN *et al.*, 2014; MANAL *et al.*, 2016): classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8), classe IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDACs 6 e 10), classe III (SIRT 1, 2 e 3) e classe IV (HDAC11), sendo elas as responsáveis por remover grupos acetil dos resíduos de lisinas das histonas e proteínas não-histonas. As HATs, por outro lado, apresentam função inversa, adicionando grupos acetil a estes mesmos resíduos. O balanço da atividade entre HDACs e HATs controla o perfil de acetilação das histonas, o que modula a transcrição de diversos genes. Os ácidos graxos de cadeia curta inibem as histonas deacetilases, principalmente as das classes I e II, com diferentes potências, sendo butirato > propionato > acetato, e com isso, regulam diversos mecanismos como, por exemplo, a produção de citocinas e a diferenciação celular (WANG *et al.*, 2009; VINOLO *et al.*, 2011a, 2011b; SMITH *et al.*, 2013).

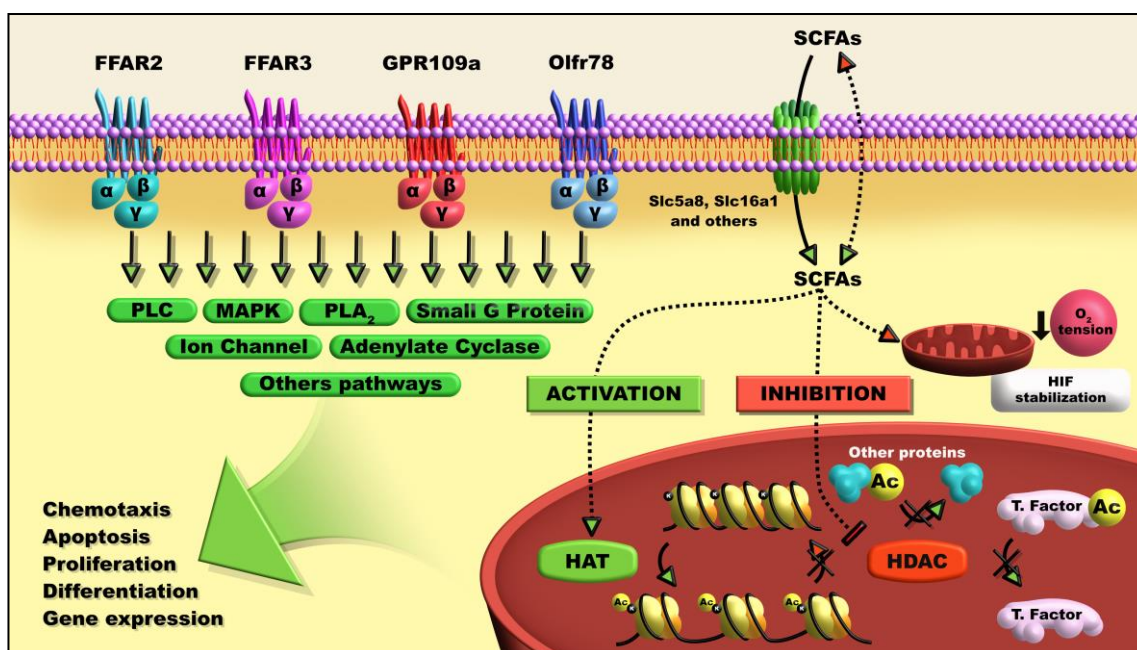


Figura 1. Vias de atuação dos ácidos graxos de cadeia curta e seus principais efeitos celulares. A ligação destes metabólitos aos receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCRs), principalmente FFAR2, FFAR3, GPR109a e Olfr78, desencadeia diversas sinalizações intracelulares que levarão às diferentes respostas celulares. Além disso, os AGCCs são ainda capazes de modificar as respostas celulares ao atuarem diretamente no núcleo ativando as histonas acetil-transferases (HATs) ou principalmente inibindo as histonas deacetilases (HDACs), enzimas que controlam a acessibilidade dos fatores de transcrição ao material genético (imagem retirada de CORRÊA *et al.*, 2016).

O receptor FFAR2 é altamente expresso em diferentes tipos celulares incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, células dendríticas e mastócitos (LE POUL *et al.*, 2003; KARAKI *et al.*, 2008; COX *et al.*, 2009). A comprovação da participação dos AGCCs e seu receptor FFAR2 no recrutamento das células imunes durante o processo inflamatório veio de dois estudos publicados em 2009. No primeiro deles, MASLOWSKI *et al.* (2009) demonstraram que os neutrófilos de animais selvagens, mas não de animais FFAR2^{-/-}, apresentaram quimiotaxia em relação ao acetato, embora apenas em altas concentrações (100 - 1000 μ M). Interessantemente, camundongos *knockout* para esse receptor apresentaram inflamação exacerbada ou sem resolução nos casos de colite aguda e crônica, artrite e asma, mesmo recebendo tratamento com acetato. A hipótese dos autores para explicar esse efeito é de que o acetato, pela ativação de FFAR2, induz a apoptose de neutrófilos, além de gerar uma dessensibilização cruzada de receptores quimioatraentes, reduzindo assim a resposta inflamatória relacionada à colite. Por outro lado, Sina *et al.* (2009) mostraram que em modelo de colite aguda, camundongos *knockout* para FFAR2 apresentaram maior mortalidade quando

comparados ao grupo selvagem. Nesses animais, foi observado um menor recrutamento leucocitário, diminuída inflamação no cólon e atenuação no dano tecidual nesta região, embora tenha havido um aumento na mortalidade dos animais, o que pode ter decorrido de complicações sépticas por *Clostridium spp.* Já no modelo de colite crônica, os animais *knockout* tiveram redução na inflamação do cólon. Deste modo, com estes resultados paradoxais entre as duas publicações, permeneceu em aberto o real entendimento dos mecanismos de ação de FFAR2 e sua associação com os AGCCs no contexto inflamatório.

Na literatura há vários artigos que demonstram a capacidade imunomodulatória dos AGCCs, a qual decorre de suas ações tanto nas células da imunidade inata quanto nas da imunidade adaptativa (conforme revisado por CORRÊA *et al.*, 2016). As células epiteliais, por exemplo, atuam não somente impedindo fisicamente a entrada de micro-organismos nocivos à saúde do hospedeiro, mas também pela produção ativa de peptídeos antimicrobianos que controlam o crescimento e a proliferação das bactérias e fungos. Neste sentido, já foi demonstrado que o butirato atua de maneira bastante significativa na manutenção da homeostase do tecido epitelial, levando a um aumento na produção dos peptídeos antimicrobianos LL-37 e CAP-18 em coelhos e humanos, bem como na expressão de β -defensinas e outras catelicidinas em porcos (RAQIB *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2013) e de IL-18 em camundongos (MACIA *et al.*, 2015). Por fim, relatou-se ainda um aumento na produção de TNF- α , IL-6, Cxcl1 e Cxcl10 pelas células epiteliais intestinais, *in vitro*, tratadas com AGCCs, efeito este dependente da ação do receptor FFAR2 (KIM *et al.*, 2013).

Macrófagos e monócitos também já foram alvos de diversos estudos, embora com algumas conclusões controversas. COX *et al.* (2009), por exemplo, nos mostram que a presença dos AGCCs *in vitro* acarretou em um perfil anti-inflamatório de monócitos humanos com redução na produção de IL-10 e de prostaglandina E₂. Além deste, outros autores mostraram que a presença dos AGCCs diminuiu a resposta inflamatória, bem como a migração, de macrófagos RAW264.7 à LPS (MAA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012; VINOLO *et al.*, 2012). Por outro lado, MIRMONSEF *et al.* (2012) observaram que a incubação de células mononucleadas de sangue periférico com os AGCCs levou-as a um perfil pró-inflamatório com aumento na produção de IL-1 β e IL-6. Neste sentido, é interessante apontar que alguns autores têm relacionado tais

divergências de resposta com o perfil de proliferação e diferenciação celular, na qual, por exemplo, o butirato atuaria inibindo o crescimento de células que possuem altas taxas de proliferação (BAILON *et al.*, 2010).

OS AGCCs também conseguem modular diversas funções dos neutrófilos (revisado por RODRIGUES *et al.*, 2016). Estudos mostram que o butirato modula negativamente a internalização e morte de micro-organismos por neutrófilos. Incubação de neutrófilos com butirato reduziu a taxa de fagocitose e morte de *Candida albicans* e inibiu a produção de superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso por estas células. Neste mesmo estudo, o acetato aumentou a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em neutrófilos de ratos enquanto o propionato não demonstrou efeito algum nessas células (VINOLO *et al.*, 2009b). VINOLO *et al.* (2011c) destacaram ainda o papel do FFAR2 como um receptor quimioatraente necessário para a migração de neutrófilos através de fontes de acetato, propionato ou butirato *in vitro*. No entanto, como os AGCCs podem ser encontrados em praticamente todos os tecidos e na grande maioria das vezes associados a diversos outros quimioatrativos mais potentes, o real papel *in vivo* dos ácidos graxos de cadeia curta na migração dos neutrófilos via FFAR2 ainda está incerto.

Estudos recentes revelam que os AGCCs são mediadores pelos quais a comunidade microbiana intestinal se comunica e interage com o sistema imune do hospedeiro, afetando o balanço entre mecanismos pró- e anti-inflamatórios. ARPAIA *et al.* (2013) demonstraram que o butirato, produzido pelas bactérias simbiotes intestinais, induz uma expressão aumentada de *foxp3* em células T CD4⁺ *in vitro*, indicando sua diferenciação em células T reguladoras (Treg). Em estudo semelhante, camundongos que receberam dieta rica em fibra e que, consequentemente, apresentaram maior concentração dos AGCCs no intestino, possuíam maior quantidade destas células Treg no cólon (mas não em órgãos imunes periféricos). Este efeito indutor é tão forte que mesmo quando linfócitos T CD4⁺ foram submetidos, *in vitro*, a condições polarizantes de Th1 e Th17, a presença do butirato na cultura foi suficiente para induzir a diferenciação dessas células em linfócitos Treg (FURUSAWA *et al.*, 2013). Os autores ainda demonstraram que o butirato aumenta a liberação de IL-10 pelas células Treg, indiciando que ele possui um papel central não apenas na diferenciação destas células no cólon, mas também em sua funcionalidade.

Considerando que os AGCCs apresentam efeitos imunomodulatórios bastante relevantes, alguns estudos passaram a sugerir a participação dos mesmos na iniciação e estabelecimento de doenças infecciosas (NIEDERMAN *et al.*, 1997a; NIEDERMAN *et al.*, 1997b; AL-MUSHRIF *et al.*, 2000). Um exemplo desta relação pode ser visto na doença periodontal, um quadro clínico que se caracteriza por um processo inflamatório crônico na região do periodonto. Embora possa ser influenciada por diferentes fatores como traumas mecânicos, nutrição, uso de tabaco e álcool, ou ainda por fatores genéticos, a principal causa de periodontite são os micro-organismos patogênicos encontrados na cavidade oral (oriundos de uma microbiota disbiótica), em especial bactérias Gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, entre outras. De fato, estudos mostram que a presença de Aa em crianças saudáveis pode servir como um fator de risco para o início da periodontite agressiva localizada (FINE *et al.*, 2007). Além destas, alguns estudos demonstram que a presença do herpes vírus ou do fungo *Candida albicans* também podem contribuir para o desenvolvimento da doença (MICHALOWICZ *et al.*, 2000; ROBINSON 2002). PIHLSTROM *et al.* (2005) nos revela que tais micro-organismos são responsáveis por liberar grandes quantidades de leucotoxinas, collagenases, fibrinolisinases e diversas proteases que ativam uma resposta inflamatória local no periodonto (tecido conjuntivo que suporta o dente), levando à formação das chamadas bolsas periodontais entre a gengiva e as raízes dos dentes. Quando em estado crônico, tal inflamação acaba por liberar constantemente moléculas ativadoras de osteoclastos, que por sua vez são as células responsáveis pela desmineralização e reabsorção do osso alveolar, tendo como consequência a perda dos dentes (CHAKRAVARTI *et al.*, 2009; HAJISHENGALLIS, 2015).

Neste sentido, estudos indicam que indivíduos com periodontite apresentam mudanças em relação às concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta na cavidade oral. Pacientes que sofrem com a periodontite crônica, por exemplo, apresentam cerca de duas vezes mais propionato e quase três vezes mais butirato no fluido gengival crevicular do que indivíduos saudáveis (QIQIANG *et al.*, 2012). Já em pacientes com periodontite generalizada agressiva, observou-se concentrações de duas a quatro vezes maiores de AGCCs no fluido gengival crevicular em comparação a indivíduos saudáveis (LU *et al.*, 2014). Interessantemente, estudos também revelam que após o

tratamento da doença, as concentrações destes metabólitos foram reduzidas drasticamente (CHAUDRY *et al.*, 2004; QIQIANG *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2014). JORTH *et al.* (2014) relacionam tais efeitos diretamente com a microbiota local. Análises de metatranscriptoma da comunidade microbiana presente na cavidade oral de indivíduos saudáveis e indivíduos com periodontite revelaram diferenças em diversos genes que estão envolvidos no metabolismo bacteriano durante a progressão da doença, incluindo enzimas que participam ativamente na produção dos ácidos graxos de cadeia curta. Dessa maneira, apesar de comprovada a presença de altas concentrações dos AGCCs nestes locais de infecção, produzidos pelas próprias bactérias anaeróbias da microbiota alterada, nenhum estudo foi realizado na tentativa de esclarecer se estes AGCCs locais interferem, positiva ou negativamente, na resposta imunológica do hospedeiro contra os agentes patológicos, ou se são apenas uma consequência de mudanças no perfil microbiano sem apresentar, no entanto, relevâncias fisiológicas.

Considerando o exposto, o presente estudo teve por objetivo investigar esta possível relação entre os AGCCs produzidos nos locais de infecção pelas bactérias anaeróbias e o desenvolvimento e progressão da infecção. Além disso, investigou-se ainda o papel do receptor FFAR2 neste contexto. Para isso, utilizamos modelo de câmara subcutânea para a geração de uma monoinfecção pela bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, associada com a periodontite agressiva localizada ou generalizada, bem como com outras infecções humanas como a endocardite, pericardite, artrite infecciosa e vários tipos de abscessos (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1999). A bactéria Aa, em especial a cepa JP2 (a qual foi utilizada no presente trabalho), é produtora de leucotoxina (LtxA), uma proteína com peso molecular aproximado de 113 kDa que apresenta alta citotoxicidade, especificamente, para as células imunes de primatas (que expressa o receptor *leukocyte function antigen 1* - LFA-1), atuando assim como um mecanismo de evasão bacteriano (como revisado por KACHLANY 2010; JOHANSSON 2011). De acordo com KACHLANY (2010), como a LtxA é altamente específica para leucócitos de primatas, fica difícil analisar seus fatores de virulência em células de camundongos ou de ratos. No entanto, alguns estudos nos mostram que a cepa JP2 de Aa é capaz de gerar perda óssea alveolar em camundongos quando

administrada oralmente (GARLET *et al.*, 2007), bem como gera grandes lesões nestes animais quando inoculadas subcutaneamente (EBERSOLE *et al.*, 1995).

Nosso modelo experimental de câmara subcutânea, originalmente proposto por GENCO *et al.* (1991), vem como uma metodologia alternativa e eficiente para o estabelecimento de uma monoinfecção em um sítio isolado dentro do organismo do animal. Em linhas gerais, uma câmara em formato de bobina, feita de aço inoxidável, é implantada subcutaneamente no dorso de camundongos C57BL/6. Após alguns dias de recuperação, há o crescimento de um tecido epitelial que circunda toda a câmara, gerando um ambiente isolado no interior do animal, porém ainda permissivo ao sistema imune, propício para a geração e manutenção de uma infecção bacteriana utilizando apenas a espécie de bactéria desejada. Desta maneira, este modelo nos permite não apenas uma análise isolada do conteúdo presente na câmara ao longo do curso da infecção para diversos estudos microbiológicos, imunológicos, citológicos e/ou bioquímicos, como também um exame dos fatores solúveis e celulares produzidos localmente pelo organismo infectado, tudo isso analisando o exsudato inflamatório que é gerado dentro da câmara. Especificamente para nosso objetivo, este modelo permitiu desenvolver uma monoinfecção de Aa em um ambiente isolado na qual foi ainda possível adicionar diferentes composições dos AGCCs, de modo a observarmos como a presença ou ausência destes metabólitos, bem como de seu receptor FFAR2, modulará a resposta imunológica do organismo hospedeiro frente à infecção bacteriana.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi o de investigar a participação *in vivo* e *in vitro* dos ácidos graxos de cadeia curta, bem como a do seu receptor FFAR2, na resposta imunológica de camundongos C57BL/6 frente à infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

2.1 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos do perfil de AGCCs encontrado nos locais de infecção sobre o recrutamento dos leucócitos;
- Avaliar possíveis modulações nos mecanismos efetores dos leucócitos, como sua capacidade de fagocitar e destruir as bactérias patogênicas, bem como sua produção de mediadores inflamatórios;
- Examinar a possibilidade de que os AGCCs interfiram com o crescimento das bactérias;
- Avaliar o padrão de resposta à infecção em animais que não expressam o receptor FFAR2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os procedimentos com animais descritos neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Protocolos 3230-1 e 4112-1) (Anexos I e II). Neste projeto foram utilizados camundongos C57BL/6 machos adultos (8 - 10 semanas de idade) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB – UNICAMP). Com o intuito de explorar o mecanismo de ação dos AGCCs, utilizamos camundongos que não expressam o receptor FFAR2 (FFAR2^{-/-}). Tais camundongos foram produzidos pela Deltagen (Califórnia, USA) como descrito na literatura (MASLOWSKI *et al.*, 2009), fornecidos em colaboração, e mantidos em *background* de C57BL/6 no Biotério de Animais Transgênicos do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Todos os camundongos foram mantidos em gaiolas com filtro na tampa e tiveram livre acesso à água e ração esterilizada.

3.2 Bactérias

Bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) cepa JP2, fornecidas pelo Laboratório de Anaeróbios coordenado pelo Prof. Mário Júlio Ávila Campos (ICB/USP), foram cultivadas em meio ágar BHI (ACUMEDIA – Indaiatuba, SP) chocolate suplementado com hemina (5 µg/mL) e menadiona (1 µg/mL), à 37° C, em anaerobiose. Para os experimentos, colônias isoladas de Aa foram coletadas em PBS estéril (pH 7,4) após 48 horas de crescimento, centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e lavadas duas vezes. Escala de McFarland foi utilizada para ajustar a concentração desejada (1x10⁹ bactérias/mL), sendo posteriormente ressuspensas em PBS estéril (pH 7,4) contendo ou não um mix dos AGCCs. Parte desta ressuspensão bacteriana foi plaqueada novamente em ágar BHI chocolate para posterior determinação da ausência de contaminações.

3.3 Implantação da câmara subcutânea

A implantação da câmara e a inoculação das bactérias em seu interior foram realizadas de acordo com protocolo anteriormente descrito por GENCO *et al.* (1991). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com mistura de xilazina e ketamina (Anasedan e Dopalen – CEVA – Paulínia, SP) nas concentrações, respectivamente, de 10 mg/Kg e 20 mg/Kg de peso corpóreo. Em seguida, foi realizado o procedimento de tricotomia do quadrante inferior do dorso do animal utilizando lâmina, com posterior assepsia da região com álcool 70%. A cirurgia consistiu na realização de incisão de 1,5 cm no dorso do camundongo e inserção da câmara subcutaneamente. As câmaras foram confeccionadas utilizando fio de aço inoxidável e possuíam 0,5 cm de diâmetro e 1 cm de comprimento. As extremidades do fio de aço da câmara foram dobradas para dentro de modo a reduzir o risco de lesão ao animal. Após sua confecção, o material foi esterilizado em autoclave. A seguir, a incisão foi fechada com supercola (cianoacrilato), seguida da aplicação de degermante (solução de PVPI a 10%) na região. Os animais foram mantidos em recuperação por 10 dias, estando no primeiro dia sob o efeito de analgésico Cetoprofeno (5 mg/kg, injetado subcutaneamente). Após esse período, a câmara de aço foi totalmente recoberta por tecido epitelial e em seu interior permaneceu um espaço livre, no qual foram inoculadas as bactérias. Nenhum sinal de infecção foi observado nos animais durante todo o protocolo experimental.



Figura 2. Morfologia da câmara subcutânea, fora do corpo do animal, 12 dias após ser implantada. Notar que a bobina de metal se encontra totalmente coberta por um tecido epitelial vascularizado. Além disso, mesmo ao final dos doze dias, a câmara ainda mantém seu formato original, não sofrendo deformidades. Tamanho da câmara: 1,0cm de comprimento x 0,5cm de diâmetro.

3.4 Infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Passados os 10 dias de recuperação dos animais, 100 µL de PBS contendo 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFCs) de bactérias (acrescidos ou não dos AGCCs) foram inoculados diretamente no interior da câmara subcutânea com o auxílio de seringa hipodérmica com agulha de 25 G estéril (BD – São Paulo, SP). Para tanto, o animal foi anestesiado com isoflurano e a assepsia do local foi realizada com etanol 70%. Os grupos controles foram inoculados apenas com PBS ou PBS com uma mistura dos AGCCs, ambos sem a presença da bactéria. Após inoculação na câmara, parte da suspensão de bactérias inicial foi plaqueada novamente em caldo BHI chocolate suplementado para contagem de UFCs (determinação do número inicial de bactérias), além de descartar possíveis contaminações.

3.5 Concentração utilizada dos ácidos graxos de cadeia curta

Foi utilizada uma mistura de AGCCs nas concentrações de 26 mM de acetato, 10 mM de propionato e 2,5 mM de butirato. Em alguns casos, os AGCCs foram utilizados isoladamente, mas sempre nestas mesmas concentrações mencionadas acima. Tais concentrações foram escolhidas baseando-se no artigo de LU *et al.* (2014) que descreve as concentrações de AGCCs encontradas no fluido gengival crevicular de indivíduos com periodontite agressiva generalizada antes do tratamento, condição infecciosa na qual há o envolvimento da bactéria Aa. Desta maneira, utilizamos concentrações que são muito próximas às observadas durante a infecção *in vivo* da Aa.

3.6 Coleta e análise do material

Após 4, 24 ou 72 horas da inoculação na câmara, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato inflamatório formado no interior da câmara foi coletado. Para evitar a coagulação do material, utilizou-se de seringa hipodérmica (BD – São Paulo, SP) contendo 30 µL de solução de EDTA 0,5M. Um mínimo de 100 µL de exsudato foi coletado, sendo posteriormente separado para diferentes análises conforme descrito abaixo:

3.6.1 Análise de mediadores inflamatórios

Cerca de 50 µL do material obtido do interior da câmara foi coletado para a quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 e das quimiocinas Cxcl1 e Cxcl2 utilizando imunoensaio enzimático (ELISA). De acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do kit (Duoset, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), placas de 96 poços foram mantidas *overnight* com anticorpo de captura. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas (PBS 0,05%-Tween 20- 0,1% albumina) por 1 hora, prosseguindo com a adição das amostras e dos padrões internos, sendo mantidas ao abrigo da luz, por 1 hora, à temperatura ambiente. Após lavagem (PBS 0,05% -Tween 20), adicionou-se o anticorpo de detecção. Após 2 horas de incubação, as placas foram lavadas, seguindo com a adição de Estreptavidina (diluída 1:200), e mantidas ao abrigo da luz por 20 min. Após nova lavagem, adicionou-se solução de substrato (Solução A e B), mantendo-as ao abrigo da luz por mais 20 min. Ao final, adicionou-se solução de HCl 2M para parar a reação e a placa foi lida no espectrofotômetro em 450 nm.

3.6.2 Análise quali- e quantitativa de leucócitos

O total de células presentes no interior da câmara foi analisado por contagem em câmara de Neubauer após lise das hemácias presentes em 10 µL de exsudato e de ressuspensão do *pellet* celular em PBS estéril. A diferenciação morfológica das células (neutrófilos e células mononucleadas) foi realizada em lâminas de citocentrifugado (Citospin/INCIBRÁS), coradas com Panótipo Rápido (LABORCLIN), utilizando outros 20 µL do exsudato.

3.6.3 Análise da capacidade de *killing* das células imunes

20 µL do material obtido foram diluídos serialmente em PBS estéril (pH 7,4) e plaqueados em ágar BHI chocolate suplementado com hemina e menadiona. As placas foram mantidas à 37°C, em anaerobiose, por 3-5 dias, seguido pela determinação do número de UFCs. Este número representa a quantidade de bactérias sobreviventes no interior da câmara, sendo inversamente proporcional à capacidade das células imunes em matar as bactérias inoculadas.

3.7 Análise da capacidade de fagocitose das células imunes

Bactérias foram ressuspensas em PBS estéril (pH 9,0) e marcadas com sonda pHrodo (pHrodo Red succinimidyl (NHS) ester - Invitrogen ThermoFisher Scientific - Waltham, Massachusetts, EUA) sob agitação, à 37°C, por 30 min ao abrigo da luz. Em seguida, as bactérias foram lavadas com PBS estéril (pH 7,4) e ressuspensas em PBS estéril contendo ou não os AGCCs. Os animais foram inoculados com 1×10^8 UFCs de bactérias previamente marcadas. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato inflamatório coletado. Os neutrófilos foram então marcados com anticorpo anti-Ly6G APC (BioLegend - San Diego, CA, USA) por 15 minutos, sendo analisados no Citômetro de Fluxo FACS Calibur (BD – São Paulo, SP). Nesses experimentos utilizou-se solução de Azul de Tripan (0,03%) para o *quenching* da fluorescência das bactérias não internalizadas que apenas se ligaram externamente às células.

3.8 Análise da viabilidade celular

O exsudato inflamatório da câmara subcutânea foi coletado quatro horas após a inoculação de Aa ou de Aa + AGCCs (nas concentrações já mencionadas). Os neutrófilos (>90% dos leucócitos presentes no exsudato) foram então marcados com anticorpo anti-Ly6G PE (BioLegend - San Diego, CA, USA), bem como com 7-AAD (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO, EUA) (marcador da integridade da membrana) e Anexina V-FITC (BioLegend - San Diego, CA, USA) (marcador de externalização da fosfatidilserina), por 15 minutos e ao abrigo da luz, sendo posteriormente analisados no Citômetro de Fluxo FACS Calibur (BD – São Paulo, SP).

3.9 Curva de crescimento da Aa

Antes da realização dos experimentos *in vivo*, testes foram realizados no intuito de analisar o crescimento bacteriano na presença dos AGCCs para verificar se os mesmos, por si só, apresentariam algum efeito direto sobre o crescimento da bactéria. Neste caso, as bactérias ($1,5 \times 10^8$ UFCs/mL) foram mantidas em caldo BHI, acrescido ou não de AGCCs isolados (Controle: PBS; Ac: acetato 26 mM; Pr: propionato 10 mM; Bt: butirato 2,5 mM), em placas de 96 wells, em estufa à 37°C. Caldo BHI sem as bactérias foi utilizado como controle negativo. Após 24 horas de cultura, a placa foi retirada da

estufa e a densidade ótica da cultura foi determinada, em 600 nm, utilizando espectrofotômetro (Synergy HT – BioTek – Winooski, VM, EUA). Além disso, as bactérias foram igualmente cultivadas, por 24 horas, na presença ou ausência do mix de AGCCs usados *in vivo*. Tais amostras foram posteriormente diluídas serialmente em PBS estéril e plaqueadas em ágar BHI chocolate suplementado para determinação do número de UFCs.

3.10 Experimentos com neutrófilos humanos

Neutrófilos humanos foram isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis usando gradiente de separação por densidade Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Os eritrócitos foram removidos utilizando tampão de lise hipotônico (0,15M NH_4Cl , 0,01M de NaHCO_3 e 0,001M EDTA, pH 7,4) e os neutrófilos foram testados quanto a capacidade de fagocitar Aa, bem como a produção de $\text{TNF-}\alpha$, ambas análises *in vitro*, na presença dos AGCCs. No primeiro caso, as bactérias foram previamente opsonizada com soro humano e marcadas com sonda pHrodo (pHrodo Red succinimidyl (NHS) ester). A opsonização é um processo que visa a ligação de opsoninas, em especial do sistema complemento, à membrana dos micro-organismos, de maneira a facilitar a fagocitose, uma vez que as células fagocíticas possuem receptores aos componentes do sistema complemento. Para isso, as bactérias foram incubadas à 37°C, por 30 min, em soro humano. Em seguida, $2,5 \times 10^7$ bactérias foram incubadas com 5×10^5 de neutrófilos isolados (MOI 1:50) por 2 horas, à 37°C, na presença ou ausência do mesmo mix dos AGCCs usados nos experimentos *in vivo* com camundongos. Por fim, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD15 APC (clone HI98 - Immunotools) e analisadas por citometria de fluxo.

Já para a análise de produção de $\text{TNF-}\alpha$, 3×10^5 de células foram incubadas na presença de 3×10^6 de Aa (MOI 1:10) com ou sem o mix dos AGCCs por seis horas. O sobrenadante da cultura foi coletado e analisado pelo método de ELISA de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do kit (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Ambos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (CAAE: 002/201160895716.7.0000.5404).

3.11 Análise dos resultados

Todos os resultados foram inicialmente analisados quanto a normalidade usando os testes de D'Agostino/Shapiro-Wilk. Comparações entre dois diferentes grupos experimentais foram realizadas por teste t ou teste de Mann Whitney. Para mais de dois grupos, as diferenças foram comparadas por ANOVA com pós-teste de Tukey. Análises foram realizadas utilizando o programa Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 – Recrutamento leucocitário para o local de infecção

Já é bem estabelecido na literatura que os ácidos graxos de cadeia curta *per se* induzem migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (MASLOWSKI *et al.*, 2009; SINA *et al.*, 2009; VINOLO *et al.*, 2009a, 2009b, 2011c). Dessa maneira, visamos inicialmente elucidar o perfil de migração celular para um local de infecção causada pela bactéria anaeróbia *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bactéria associada com a periodontite agressiva localizada e generalizada. Para isso, utilizamo-nos de um modelo de câmara subcutânea (GENCO *et al.*, 1991) para geração de uma monoinfecção por Aa em camundongos C57BL/6.

Primeiramente, analisamos o recrutamento celular para o interior da câmara subcutânea sem a presença da bactéria, apenas com inoculação de PBS (Grupo PBS) ou PBS acrescido de um mix dos AGCCs nas concentrações de 26 mM acetato, 10 mM propionato e 2,5 mM butirato (Grupo PBS + AGCCs), concentrações estas que remetem às mesmas encontradas no fluido gengival crevicular de pacientes com periodontite generalizada agressiva antes de receberem os devidos tratamentos (LU *et al.*, 2014). Nosso intuito era o de determinar se os AGCCs apresentariam um efeito quimiotático nas células imunes neste modelo experimental. No entanto, conforme apresentado na figura 3, foi possível observar que a presença dos AGCCs não alterou o padrão de migração celular quando comparado ao grupo controle inoculado apenas com PBS. Por este motivo, para os próximos experimentos, o grupo PBS foi utilizado como sendo nosso grupo controle (CN – controle negativo).

Em seguida, analisamos a migração celular após a inoculação da bactéria Aa (1×10^8 UFCs/100 μ L). Para tal, utilizamo-nos de duas condições: 1) inoculação de suspensão de bactéria em PBS estéril (Grupo Aa); 2) inoculação de suspensão de bactéria no mesmo mix de AGCCs citado acima (Grupo Aa + AGCCs). As análises foram realizadas nos tempos de 4 (Figura 4A-4C), 24 (Figura 4B-4C) e 72 horas (Figura 4C). Como mostrado na figura 4, a inoculação da bactéria induziu um acúmulo massivo de células, predominantemente neutrófilos polimorfonucleares (Figura 4C), no interior da câmara. Os valores das médias de cada grupo para cada tempo podem ser encontrados nas tabelas 1, 2 e 3. De fato, foi observado um aumento de 3,8, 9,6 e 4,5

vezes no número total de células nos tempos de 4, 24 e 72 horas, respectivamente, após inoculação da bactéria quando comparado ao controle negativo (CN). Assim, temos que o acúmulo de leucócitos em resposta à bactéria foi quantitativamente o mesmo independentemente da presença ou ausência dos AGCCs, tanto para o número total de células quanto para o número de neutrófilos e células mononucleadas em todos os tempos analisados (Figura 4).

A figura 4C também nos revela que a resposta contra a bactéria inoculada é autolimitada, isto é, apresenta um máximo de migração celular, vindo a cair no tempo máximo analisado de 72 horas. Também foi possível observar que os neutrófilos são o tipo celular que predomina no interior da câmara em todos os tempos analisados.

Em conclusão, tais resultados nos mostram que a presença dos AGCCs no local de infecção, mimetizando a produção destes metabólitos pela microbiota disbiótica, não apresenta efeito significativo sobre o recrutamento de células em nosso modelo.

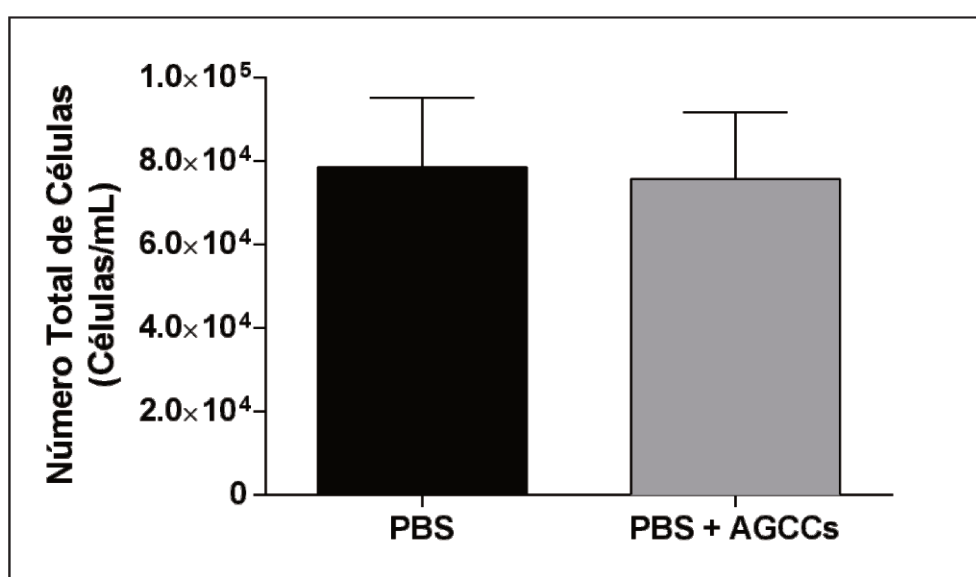


Figura 3: Recrutamento leucocitário para o interior da câmara subcutânea quatro horas após a inoculação de PBS ou PBS acrescido de um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato e 2,5 mM butirato). N = 6 animais (Grupo PBS) e 9 animais (Grupo PBS + AGCCs), divididos em três experimentos distintos. Os dados de ambos são a média $\pm$ SEM e foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$.

Tabela 1 – Padrão de migração leucocitária no tempo de 4 horas.

	Número Total de Células ($\times 10^5$)	Número de Células Mononucleadas ($\times 10^5$)	Número de Neutrófilos ($\times 10^5$)
Aa (n=12)	2,49 $\pm$ 0,30	0,26 $\pm$ 0,04	2,23 $\pm$ 0,30
Aa + AGCCs (n=10)	2,03 $\pm$ 0,40	0,16 $\pm$ 0,03	1,87 $\pm$ 0,40
Controle Negativo (n=3)	0,65 $\pm$ 0,20	0,29 $\pm$ 0,08	0,36 $\pm$ 0,06

Tabela 2 – Padrão de migração leucocitária no tempo de 24 horas.

	Número Total de Células ($\times 10^5$)	Número de Células Mononucleadas ($\times 10^5$)	Número de Neutrófilos ($\times 10^5$)
Aa (n=18)	6,66 $\pm$ 1,80	1,09 $\pm$ 0,20	5,57 $\pm$ 1,60
Aa + AGCCs (n=12)	9,83 $\pm$ 4,40	1,18 $\pm$ 0,30	8,65 $\pm$ 4,10
Controle Negativo (n=4)	0,69 $\pm$ 0,20	0,38 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,10

Tabela 3 – Padrão de migração leucocitária no tempo de 72 horas.

	Número Total de Células ($\times 10^5$)	Número de Células Mononucleadas ($\times 10^5$)	Número de Neutrófilos ($\times 10^5$)
Aa (n=5)	3,2 $\pm$ 0,69	0,1 $\pm$ 0,02	3,1 $\pm$ 0,60
Aa + AGCCs (n=5)	2,8 $\pm$ 0,38	0,1 $\pm$ 0,03	2,7 $\pm$ 0,40
Controle Negativo (n=3)	0,71 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,08	0,5 $\pm$ 0,12

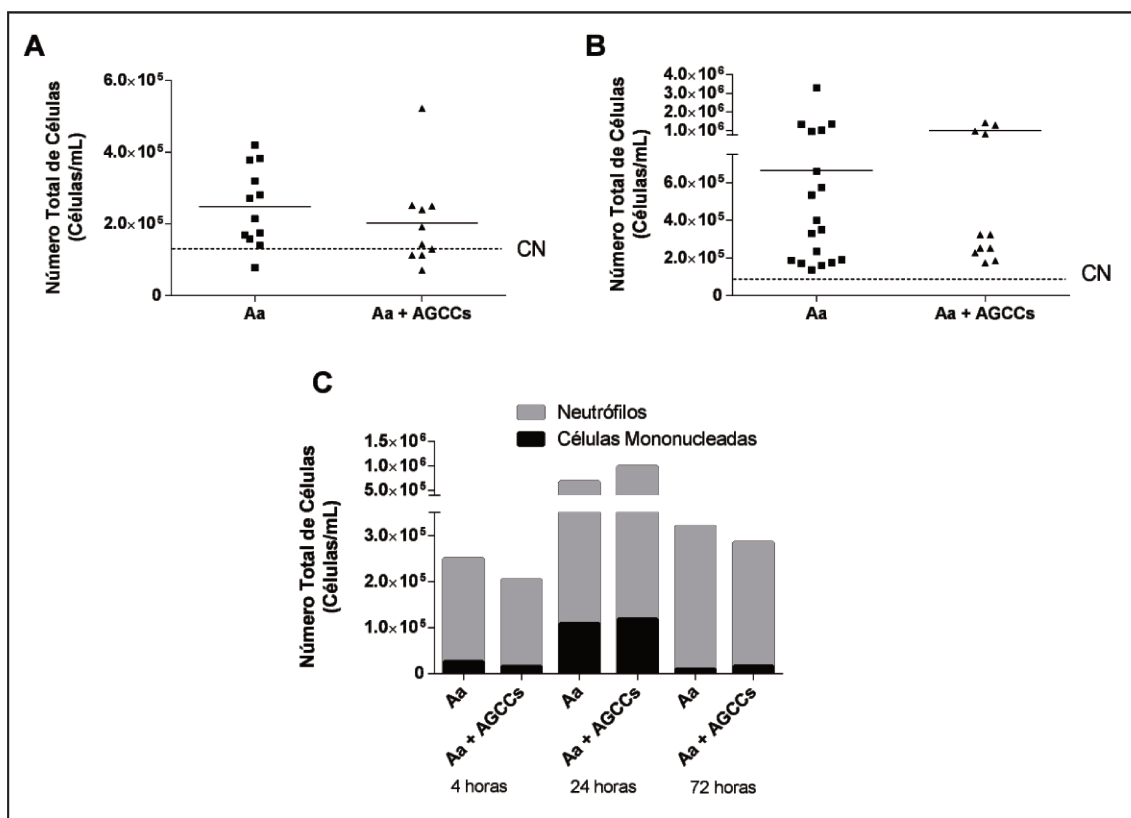


Figura 4: Recrutamento leucocitário para o interior da câmara subcutânea (A) 4 horas ou (B) 24 horas após a inoculação de Aa acrescida ou não de um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato). Nos gráficos, cada quadrado ou triângulo representa um animal de cinco experimentos distintos. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 10-18 animais por grupo). A linha tracejada representa a média do grupo controle negativo (inoculado apenas com PBS, sem bactéria). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. (C) Perfil da migração de leucócitos ao longo do tempo, mostrando a média do total de células, bem como de neutrófilos e células mononucleadas recrutados para o interior da câmara após inoculação de Aa.

4.2 – Modulação na capacidade fagocítica dos neutrófilos

À continuação, nós avaliamos a quantidade de bactérias viáveis no interior da câmara subcutânea nos tempos de 4 ou 24 horas após inoculação da bactéria, acrescida ou não dos AGCCs.

Para tanto, parte do exsudato inflamatório obtido dos animais foi serialmente diluído em PBS estéril e posteriormente plaqueado em ágar BHI chocolate suplementado com hemina e menadiona. As placas foram mantidas em anaerobiose, à 37°C, por 3-5 dias. Em seguida, foi determinado o número de UFCs em cada placa. O crescimento das colônias nos revela, indiretamente, a capacidade das células que migraram para o local da infecção em matar as bactérias ali presentes. Dessa maneira,

quanto maior o número de UFCs, menor a capacidade microbicida das células recrutadas ao tecido. Um exemplo do crescimento bacteriano na placa de BHI chocolate pode ser visto na figura 5.

O número de bactérias viáveis no interior da câmara cai rapidamente após sua inoculação. De fato, já nas primeiras quatro horas, temos uma queda de 90% no número originalmente inoculado (1×10^8 UFCs). Importante mencionar que não detectados nenhum sinal de disseminação sistêmica da bactéria, revelando que no modelo experimental neste trabalho a infecção é localizada e autolimitada (dados não mostrados).

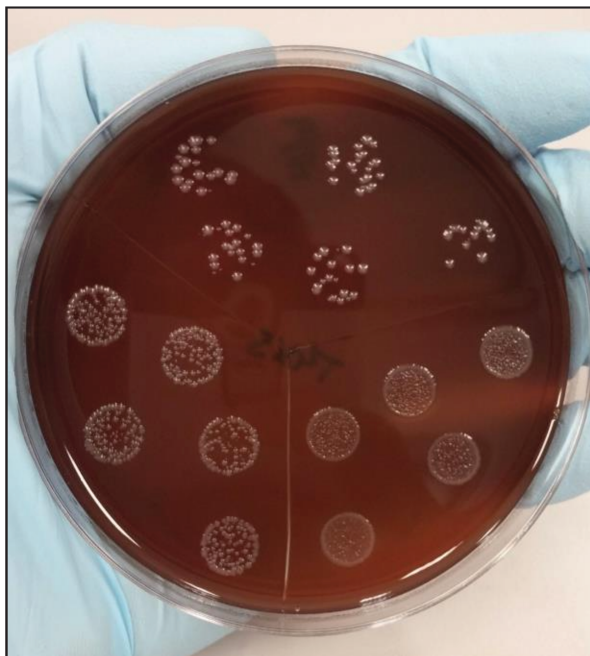


Figura 5: Exemplo de placa ágar BHI chocolate plaçada com três diferentes diluições do exsudato inflamatório da câmara subcutânea mostrando o crescimento bacteriano (UFCs) após cinco dias de cultura, em anaerobiose, à 37°C. (A) diluição 1:10; (B) diluição 1:1000; (C) diluição 1:10.000. Cada círculo (gota) representa uma replicata, sendo cinco replicatas por diluição; um animal por placa.

Na presença dos ácidos graxos de cadeia curta o número de bactéria viáveis foi significativamente maior nos tempos de 4 (cerca de 3 vezes mais bactéria viáveis) e 24 horas (cerca de 10 vezes mais bactéria viáveis) quando comparado ao grupo controle sem os AGCCs (Figura 6A e 6B).

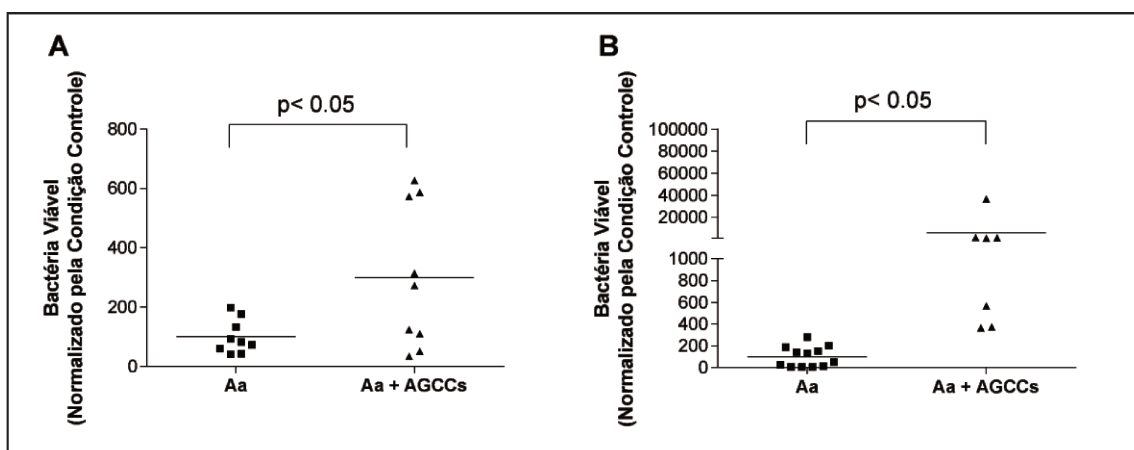


Figura 6: Análise da sobrevivência das bactérias na câmara subcutânea. O exsudato inflamatório foi diluído, plaqueado em ágar BHI chocolate suplementado, mantido em anaerobiose, à 37°C, por 3-5 dias, para determinação do número de UFCs. Os valores obtidos foram posteriormente normalizados pelos valores obtidos no grupo controle (Aa). Nos gráficos, cada quadrado ou triângulo representa um animal de cinco experimentos distintos. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 7-12 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. 'AGCCs' representa um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato).

Para descartar a possibilidade de haver mais bactérias viáveis na presença dos AGCCs devido efeito citotóxico direto destes metabólitos nos leucócitos que migraram para a câmara, realizamos um experimento de análise de viabilidade celular. Com estas análises, foi possível constatar que poucas células (cerca de 1-2%) apresentaram perda da integridade de membrana (células 7-AAD⁺) ou externalização de fosfatidilserina (células Anexina V FITC⁺), efeito este que não diferiu quando da presença (Figura 7B) ou ausência (Figura 7A) dos AGCCs. Com isso temos que, os AGCCs nas condições *in vivo* utilizadas neste estudo, não apresentam citotoxicidade relevante neste modelo.

Outro fato que poderia estar relacionado aos resultados de sobrevivência das bactérias acima apresentados é o de um possível efeito direto dos ácidos graxos de cadeia curta no crescimento bacteriano. Para testar esta hipótese, a bactéria Aa foi cultivada em caldo BHI líquido, na presença ou ausência dos AGCCs isolados (mas nas mesmas concentrações citadas anteriormente), em anaerobiose, à 37°C, por 48 horas. A densidade ótica da cultura foi medida no tempo de 24 horas. Além disto, a bactéria também foi cultivada desta mesma maneira, por 24 horas, mas agora na presença ou ausência do mix dos AGCCs usado nos experimentos *in vivo*. Em seguida, estas amostras foram plaqueadas em ágar BHI chocolate suplementado para determinação do número de UFCs. Conforme exposto na figura 8, o crescimento bacteriano foi

estatisticamente semelhante, independente da presença ou ausência dos AGCCs (Figura 8). Vemos, portanto, que os AGCCs não apresentam, nas concentrações utilizadas, efeito sobre o crescimento bacteriano.

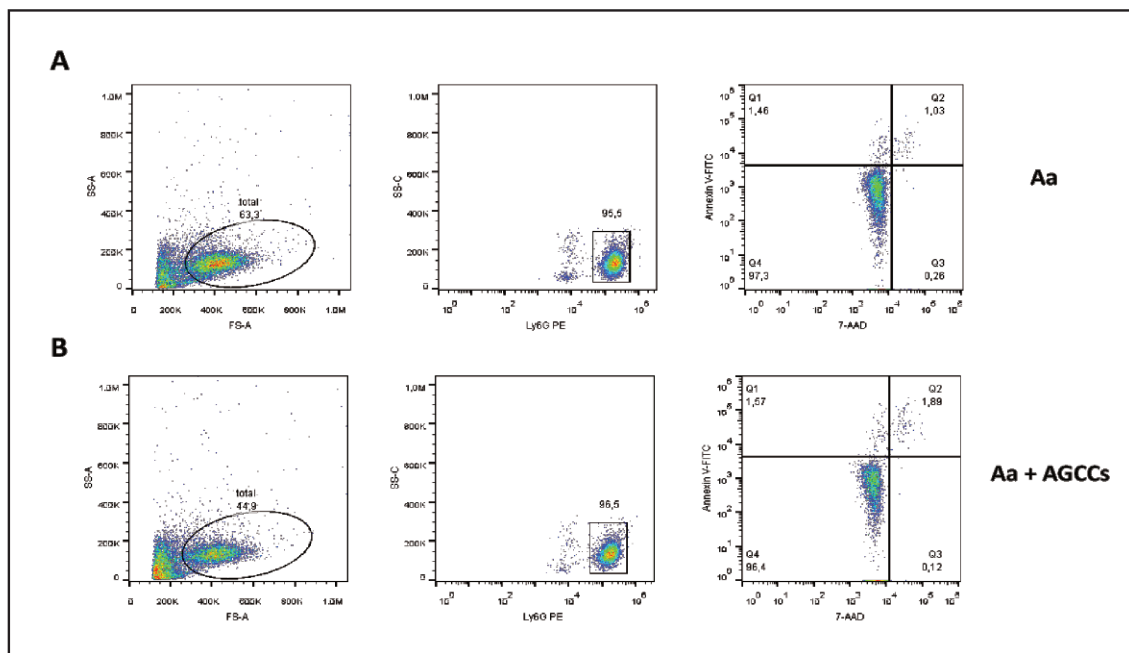


Figura 7: Análise de viabilidade celular na presença dos ácidos graxos de cadeia curta. O exsudato inflamatório foi coletado do interior da câmara quatro horas após inoculação da bactéria isoladas (A) ou acrescidas com um mix de AGCCs (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato) (B). As células foram marcadas com o anticorpo anti-Ly6G-PE, bem como com Anexina V-FITC e 7-AAD para posterior análise em citometria de fluxo. N = 4 animais. O primeiro *gate* foi delimitado com base na população celular com tamanho maior. Já o segundo *gate* foi delimitado na população de células Ly6G PE positivas (neutrófilos). Assim, o terceiro gráfico nos mostra a porcentagem de células viáveis (população negativa para 7-AAD e Anexina V-FITC).

Tendo em vista que os AGCCs não apresentaram efeitos no crescimento bacteriano nem citotoxicidade sobre os leucócitos que migraram para a câmara, mas ainda assim houve um aumento significativo no número de bactérias viáveis no interior da câmara quando em presença destes metabólitos, nossa hipótese seguinte foi a de que os AGCCs estariam reduzindo a capacidade fagocítica dos neutrófilos, um dos principais mecanismos efetores destas células no combate às bactérias. Assim, a bactéria Aa foi marcada previamente com a sonda pHrodo e inoculada no interior da câmara subcutânea seguindo o mesmo protocolo descrito para os experimentos anteriores. A sonda pHrodo, conforme publicado por SIMONS (2010), é um corante fluorescente sensível às mudanças de pH. Em resumo, as bactérias marcadas são internalizadas nos fagossomos que irão, posteriormente, se fundir ao lisossomo no

citoplasma (formando o fagolisossomo). Este, por sua vez, tem seu pH reduzido para a destruição dos micro-organismos ali contidos. Tal mudança de pH fará a sonda emitir seu sinal de fluorescência, indicando, assim, a taxa fagocítica das células do hospedeiro. Quatro horas após a inoculação das bactérias marcadas, o exsudato inflamatório foi coletado e as células presentes foram marcadas com anticorpo anti-Ly6G para análise por citometria de fluxo. A escolha do tempo de quatro horas foi baseada em experimentos anteriores que mostraram ser este um período de tempo suficiente para uma boa análise de fagocitose em nosso modelo *in vivo* (dados não mostrados).

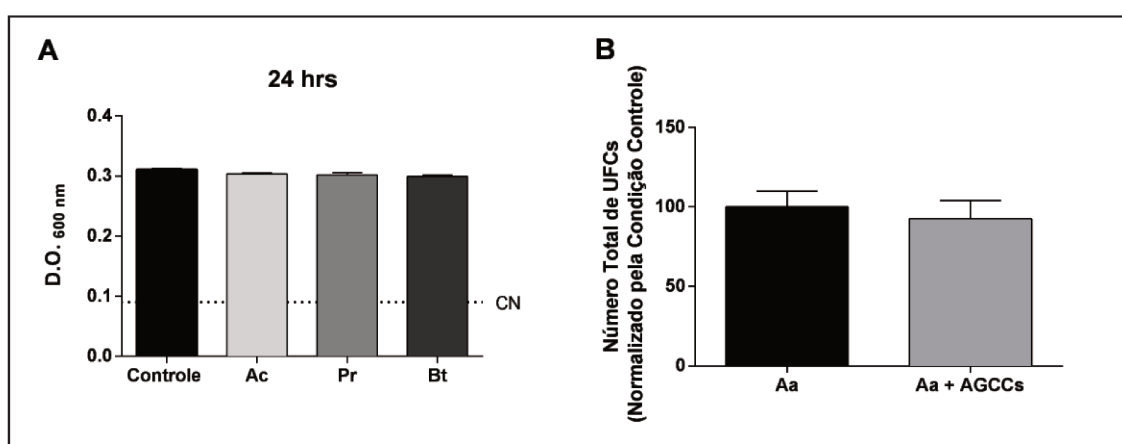


Figura 8: Análise do crescimento bacteriano na presença dos ácidos graxos de cadeia curta. (A) A bactéria Aa foi cultivada em caldo BHI líquido, na presença ou ausência dos AGCCs, por 24 horas. Controle: PBS; Ac: acetato 26 mM; Pr: propionato 10 mM; Bt: butirato 2,5 mM. CN representa o controle negativo, isto é, caldo BHI líquido sem a bactéria. Os resultados representam a média da densidade óptica (D.O.) de dois experimentos distintos, com N = 12-14 amostras por grupo. (B) A bactéria foi incubada, por 24 horas, em caldo BHI líquido com ou sem a adição de um mix de AGCCs (nas mesmas concentrações anteriores), sendo posteriormente plaqueadas para contagem das UFCs. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM, e representam os resultados de dois experimentos distintos.

A figura 9 nos mostra que, de fato, a presença dos ácidos graxos de cadeia curta no local da infecção levou a uma redução (cerca de 40%) na capacidade fagocítica dos neutrófilos que migraram para o interior da câmara subcutânea quando comparados ao grupo controle inoculado sem os AGCCs. Em conjunto, esses resultados nos mostram que os ácidos graxos de cadeia curta nos locais de infecção não atuam no crescimento bacteriano *per se*, nem apresentam papel citotóxico às células imunes que migram para combater a infecção, mas atuam, na verdade, reduzindo a capacidade fagocítica de neutrófilos, o que acarreta em uma maior sobrevivência bacteriana e, conseqüentemente, um avanço no quadro infeccioso.

Tendo em vista os achados na câmara subcutânea, à continuação analisamos o efeito dos AGCCs em neutrófilos isolados *in vitro*. Estes experimentos foram realizados tanto em neutrófilos murinos (VIEIRA 2016) quanto em humanos (resultados ora apresentados neste trabalho). Vale ressaltar que a cepa de Aa utilizada neste trabalho produz grandes quantidades de LtxA, a qual atua em células imunes de primatas (KACHLANY 2010; JOHANSSON 2011).

Nestes experimentos *in vitro*, neutrófilos foram isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis e incubados, por 2 horas, na presença de Aa, previamente opsonizadas com soro humano e marcadas com sonda pHrodo, acrescidas ou não do mix de AGCCs (26 mM acetato, 10 mM propionato e 2,5 mM biturato). Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD15 e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos (porcentagem de neutrófilos que fagocitaram Aa) foram normalizados pelos valores da condição controle e são apresentados na figura 10. De maneira semelhante aos experimentos *in vivo* com camundongos, vemos que a presença dos AGCCs *in vitro* levou a uma redução significativa (quase 50%) na porcentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias Aa quando comparados ao grupo controle incubado apenas com as bactérias sem a presença dos metabólitos (Figura 10).

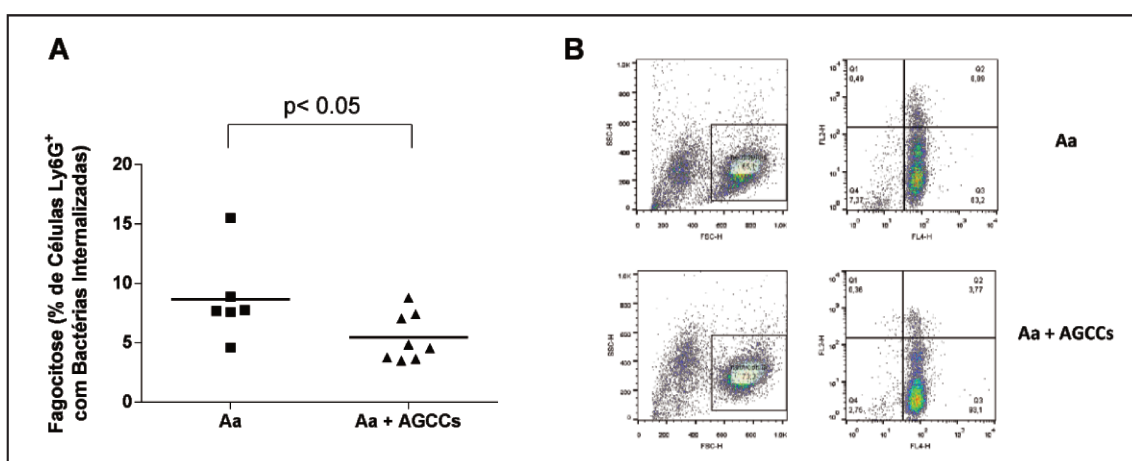


Figura 9: Análise da capacidade dos neutrófilos (células Ly6G⁺) que migram para o interior da câmara em fagocitar as bactérias (marcadas com sonda pHrodo) inoculadas. Experimento realizado no tempo de 4 horas após inoculação. No gráfico A, cada quadrado ou triângulo representa um animal. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 6-8 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. Em B, figura representativa da citometria de fluxo mostrando a porcentagem de neutrófilos que fagocitou as bactérias. ‘AGCCs’ representa um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato).

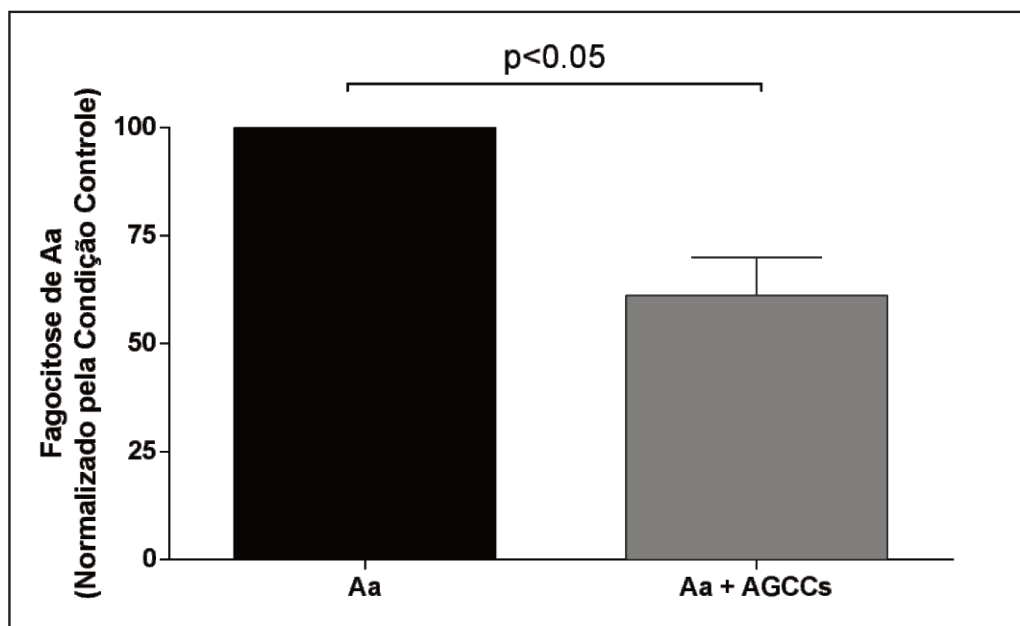


Figura 10: Análise da capacidade *in vitro* dos neutrófilos humanos em fagocitar as bactérias (opsonizadas e marcadas com sonda pHrodo), no tempo de duas horas. Resultados obtidos após análise por citometria de fluxo. N = 5 amostras. Os resultados foram normalizados pelo valor do grupo controle Aa (sem AGCCs) e são apresentados como média $\pm$ SEM. Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. 'AGCCs' representa um mix dos ácidos graxos de cadeia curta (26 mM acetato, 10 mM propionato, 2,5 mM butirato).

4.3 – Modulação na produção de mediadores inflamatórios

A seguir, analisamos a concentração de mediadores pró- (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, Cxcl-1 e Cxcl-2) e anti-inflamatórios (IL-10) no exsudato obtido do interior da câmara subcutânea. O exsudato foi coletado 4 e 24 horas após a inoculação das bactérias Aa acrescidas ou não do mesmo mix de AGCCs utilizado nos experimentos anteriores. Obviamente, a presença da bactéria por si só foi o suficiente para elevar a produção das citocinas e quimiocinas: aumentos de, aproximadamente, duas mil vezes para TNF- α , IL-6 e Cxcl1, cem vezes para IL-10 e vinte e cinco vezes para IL-1 β e Cxcl2, foram observados quando da presença de Aa na câmara (no tempo de quatro horas) em comparação a condição sem bactéria. Os resultados no tempo de 24 horas nos mostram que a quantidade dos mediadores inflamatórios cai drasticamente (Figura 11), com exceção de IL-12 cujas concentrações foram baixas nos dois tempos analisados (Figura 11E).

Comparando os resultados obtidos na presença ou ausência dos AGCCs, temos que no tempo de 4 horas não houve diferença significativa entre os grupos para nenhuma citocina analisada (Figura 11). Já no tempo de 24 horas, apesar da queda

geral na quantidade dos mediadores inflamatórios, a presença dos AGCCs levou a uma redução ainda mais intensa na concentração de TNF- α (Figura 11A), IL-10 (Figura 11D) e Cxcl2 (Figura 11G) quando comparados ao grupo controle sem a presença dos metabólitos, efeito não observado para IL-1 β , IL-6, IL-12 e Cxcl1 (Figuras 11B, 11C, 11E e 11F, respectivamente), o que indica não se tratar de um efeito inespecífico e geral dos AGCCs.

Foi também avaliada a produção de TNF- α no sobrenadante de cultura de neutrófilos humanos incubados com Aa por seis horas na presença ou não do mix de AGCCs. Desta vez, no entanto, o mix foi adicionado em diferentes diluições (diluído duas, cinco ou vinte vezes em relação ao mix original utilizado nos experimentos anteriores). Conforme apresentado na figura 12, houve uma redução na concentração de TNF- α quando em presença dos AGCCs, efeito esse que apresentou um perfil dose-dependente.

Com base nesses resultados, vemos que os ácidos graxos de cadeia curta presentes nos locais de infecção por bactérias anaeróbias são capazes de modular não somente a capacidade de neutrófilos em fagocitar os micro-organismos, mas também sua produção de mediadores inflamatórios, os quais orquestram toda a resposta imunológica.

4.4 – Análises em camundongos FFAR2^{-/-}

Tendo determinado os principais efeitos imunomodulatórios dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelas bactérias anaeróbias em seus locais de infecção, nosso próximo objetivo foi o de investigar o papel do receptor FFAR2, o principal receptor de AGCCs altamente expresso em neutrófilos e macrófagos (KIM *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2015), na resposta imune em nosso modelo. Para isto, animais FFAR2 *knockout* de corpo inteiro foram utilizados. Estes animais juntamente com os seus controles (*wild-type*) foram submetidos aos mesmos experimentos em modelo de câmara subcutânea já descritos. Vale a pena ressaltar que no presente estudo, foram realizados apenas experimentos com os animais FFAR2^{-/-} na presença ou ausência da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, no tempo de 24 horas, uma vez que foi neste período de tempo em que obtivemos os resultados mais significativos nos experimentos anteriores.

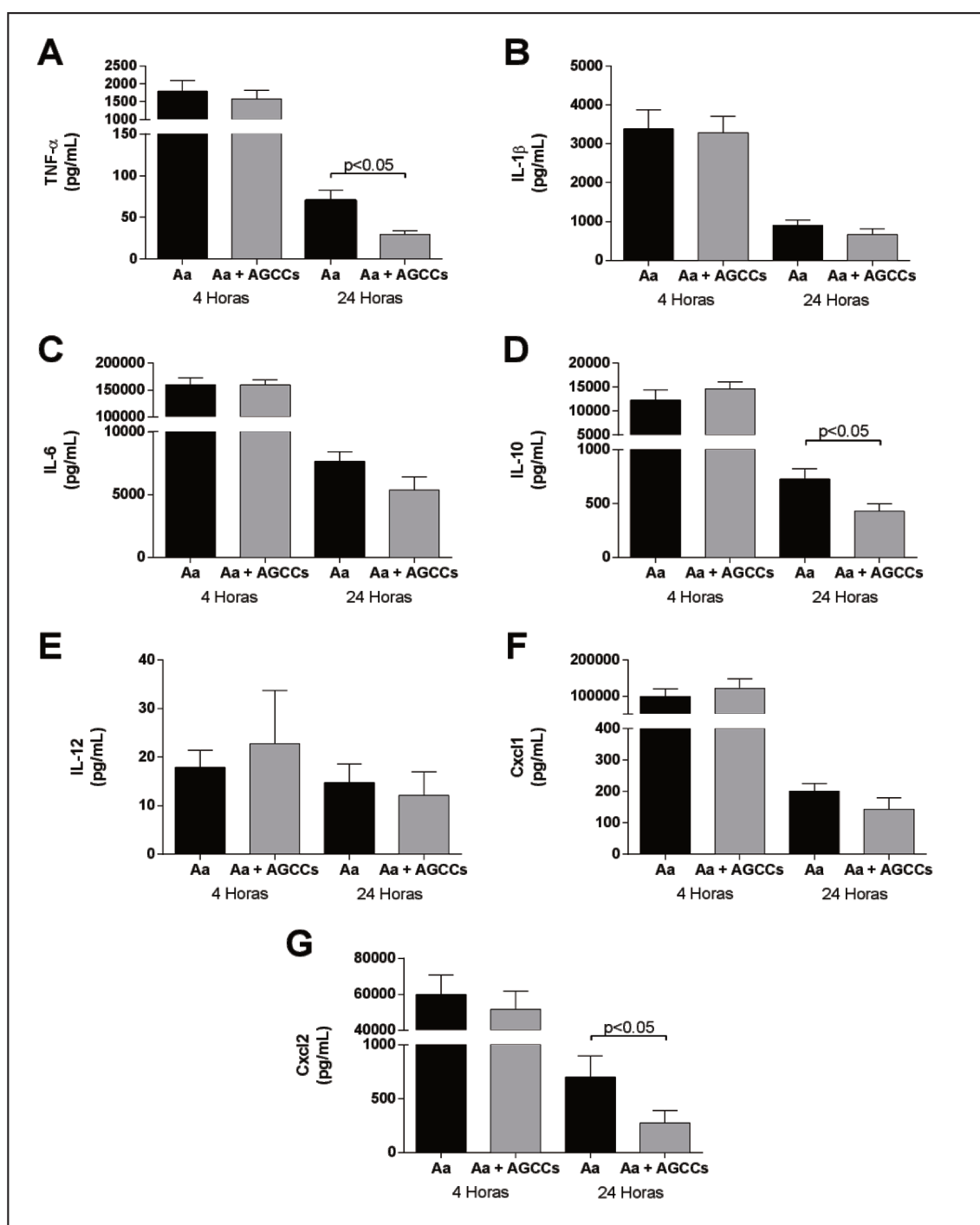


Figura 11: Análise da produção de mediadores inflamatórios pelas células imunes no interior da câmara subcutânea. As concentrações das citocinas e quimicinas no exsudato inflamatório da câmara subcutânea foram medidas pelo método de ELISA, 4 e 24 horas após inoculação da bactéria Aa acrescida ou não do mix dos AGCCs (26 mM acetato, 10 mM propionato e 2,5 mM butirato). N = 7-12 animais para o tempo de 4 horas e de 10-18 animais para o tempo de 24 horas. Resultados apresentados como média $\pm$ SEM e analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$.

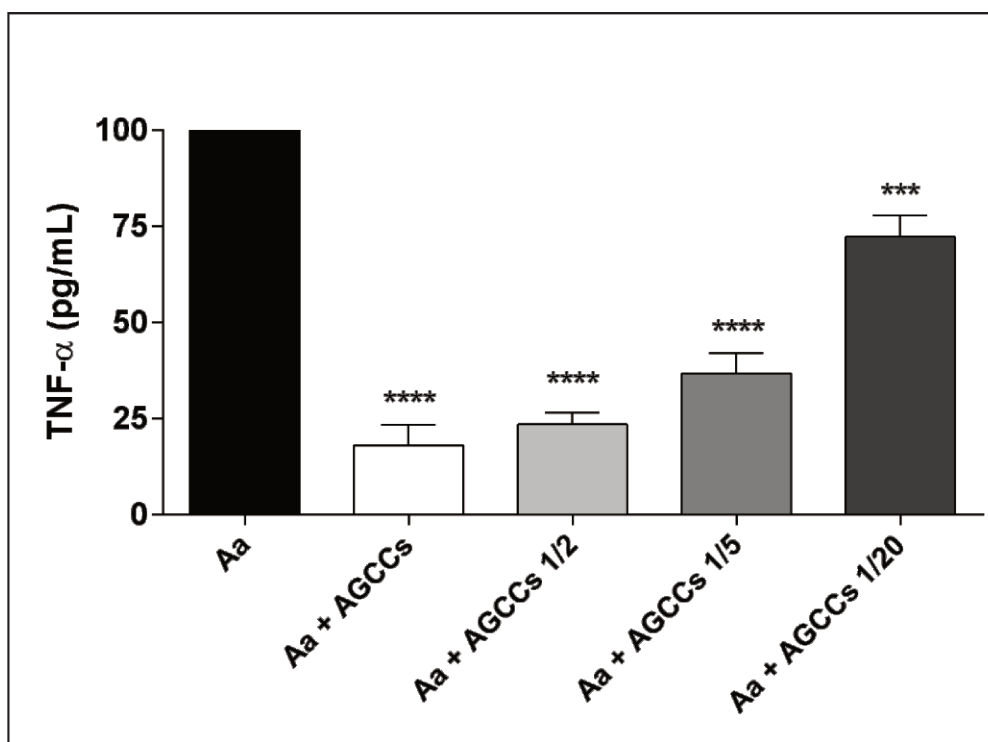


Figura 12: Análise da modulação da produção de TNF- α pelos ácidos graxos de cadeia curta em neutrófilos humanos *in vitro*. As células foram mantidas em cultura por 6 horas, na presença de Aa com ou sem o mix dos AGCCs (26 mM acetato, 10 mM propionato e 2,5 mM butirato). Há ainda outros grupos em que as células foram incubadas com Aa na presença de diferentes diluições deste mix dos AGCCs. N = 5 amostras para cada grupo. Resultados apresentados como média $\pm$ SEM e analisados pelo teste de Tukey, com significância considerada para $p < 0,05$ (** para $p < 0,01$ e **** para $p < 0,0001$).

4.4.1 – Recrutamento leucocitário para o local de infecção

Com o intuito de analisar a participação do receptor FFAR2 na resposta as bactérias Aa, repetimos as análises realizadas no modelo de infecção subcutânea agora em animais FFAR2^{-/-}. O exsudato inflamatório foi coletado após 24 horas da inoculação das bactérias (neste caso sem os AGCCs). Esse material foi processado conforme já descrito e utilizado para analisar a migração celular, bem como a produção de citocinas e o *killing* de Aa.

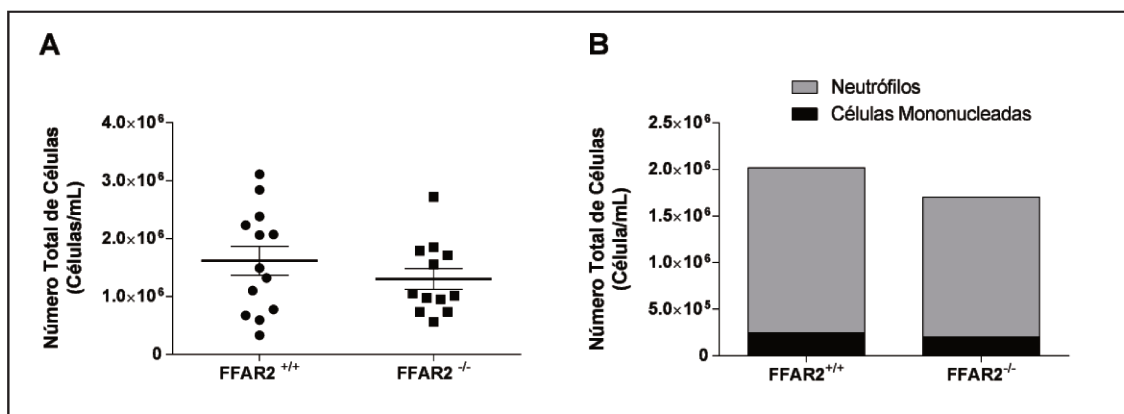


Figura 13: Recrutamento leucocitário para o interior da câmara subcutânea 24 horas após a inoculação de Aa nos animais FFAR2^{+/+} ou FFAR2^{-/-}. (A) Cada círculo ou quadrado representa um animal de quatro experimentos distintos. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 12-13 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$. (B) Perfil da migração de leucócitos no tempo de 24 horas, mostrando a média de migração de cada tempo de cada grupo, bem como diferenciado os dois tipos celulares predominantes (neutrófilos e células mononucleadas).

A média de migração leucocitária foi estatisticamente a mesma entre os animais FFAR2^{-/-} e FFAR2^{+/+} (Figura 13A), tanto no número total de células como no número de neutrófilos e células mononucleadas (Figura 13B). Com isso, podemos inferir que o receptor dos AGCCs FFAR2 não participa de maneira significativa na migração dos leucócitos para o local de infecção em nosso modelo.

4.4.2 – Alteração na sobrevivência das bactérias

A quantidade de bactérias viáveis no interior da câmara foi analisada no tempo de 24 horas após inoculação de Aa. Para tanto, como já citado, parte do exsudato inflamatório foi serialmente diluído em PBS estéril e plaqueado em ágar BHI chocolate, suplementado com hemina e menadiona. As placas foram mantidas em anaerobiose, à 37°C, por 3-5 dias. Em seguida, foi determinado o número de UFCs em cada placa.

A figura 14 nos relewa que os animais que não expressam o receptor FFAR2 possuem uma deficiência na resposta imune contra a Aa, uma vez que em tais animais encontramos um aumento significativo na média de bactérias viáveis no local infeccioso quando comparada aos animais selvagens (FFAR2^{+/+}).

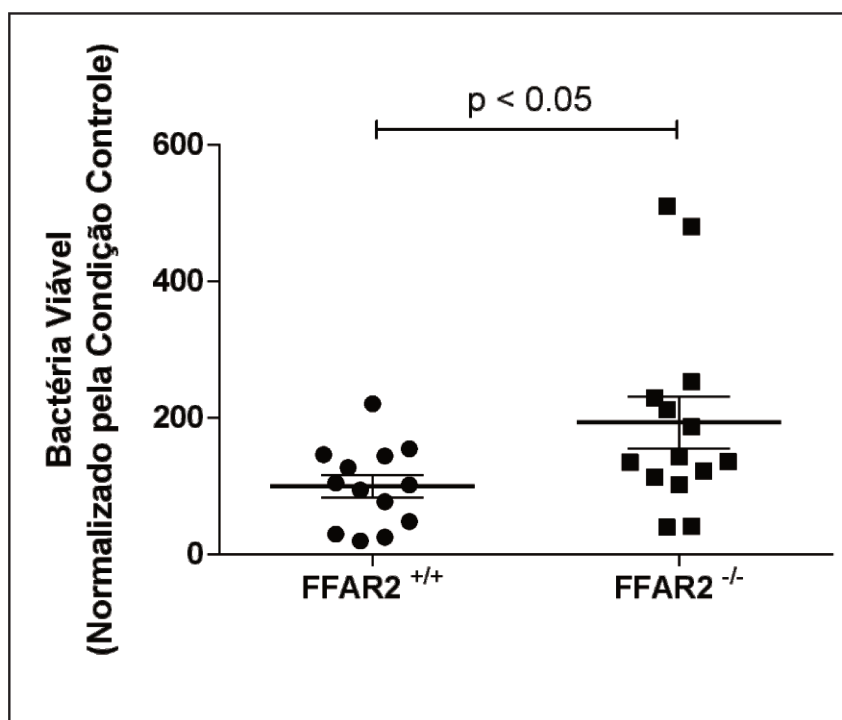


Figura 14: Análise da sobrevivência das bactérias na câmara subcutânea. O exsudato inflamatório foi diluído, plaqueado em ágar BHI chocolate, mantido em anaerobiose, à 37°C, por 3-5 dias, para determinação do número de UFCs. Os valores foram posteriormente normalizados pelos valores obtidos nos animais FFAR2^{+/+}. Nos gráficos, cada círculo ou quadrado representa um animal de quatro experimentos distintos. As barras horizontais representam a média de cada grupo (N = 13-14 animais por grupo). Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$.

4.4.3 – Modulação na produção de mediadores inflamatórios

A produção de mediadores inflamatórios pelas células que migram ao local de infecção é capaz de nos revelar muito sobre o perfil da resposta de tais células frente aos micro-organismos ali presentes. Neste caso, vemos que a presença ou ausência do receptor não influenciou de maneira significativa a produção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, bem como das quimiocinas Cxcl1 e Cxcl2, embora a falta dos receptores reduziu significativa a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória importante no controle e resolução da inflamação (Figura 15D).

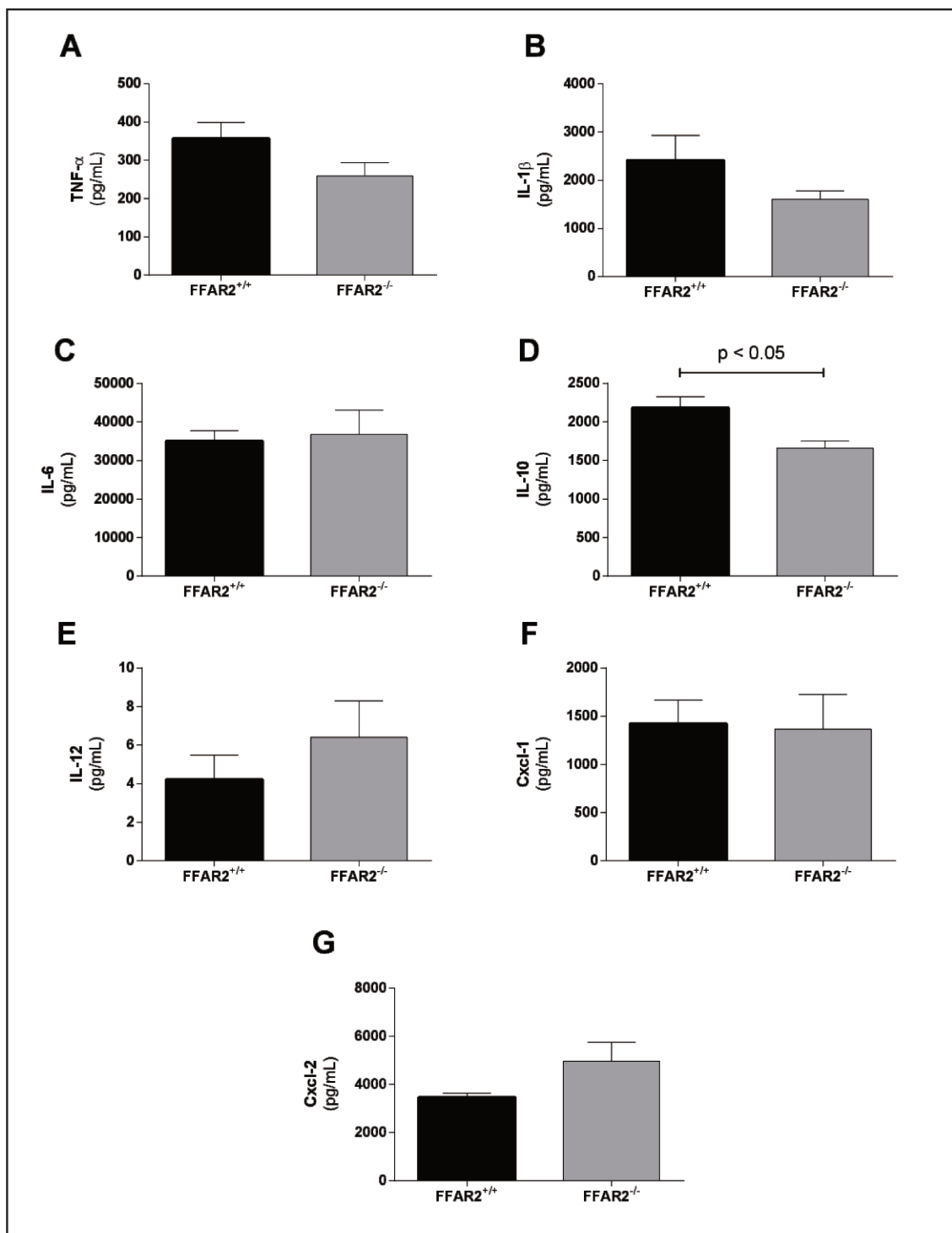


Figura 15: Análise da produção de mediadores inflamatórios pelas células imunes no interior da câmara subcutânea. As concentrações no exsudato inflamatório da câmara subcutânea foram medidas pelo método de ELISA, 24 horas após inoculação da bactéria. N = 5–8 animais. Resultados apresentados como média ± SEM e analisados pelo teste de Mann-Whitney, com significância considerada para $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos que os ácidos graxos de cadeia curta presentes no local de infecção reduzem a capacidade fagocítica de neutrófilos e modificam a sua produção de mediadores inflamatórios. Esses resultados indicam que a presença dos AGCCs pode contribuir para o início ou progressão do quadro infeccioso, uma vez que atenuam a ação de um importante componente do sistema imune inato do hospedeiro contra os micro-organismos. Além disto, nossos resultados demonstram a importância do receptor FFAR2 na montagem da resposta imunológica contra a bactéria Aa, tendo em vista que animais *knockout* para este receptor apresentaram menor capacidade de combater e destruir essas bactérias.

Diversos estudos vêm sendo realizados visando elucidar o papel dos ácidos graxos de cadeia curta em condições inflamatórias, muito embora tal papel ainda seja motivo de discussões devido aos resultados controversos na literatura (MASLOWSKI *et al.*, 2009; SINA *et al.*, 2009; COX *et al.*, 2009; MIRMONSEF *et al.*, 2012). Embora já se saiba que as bactérias anaeróbias produzem quantidades significativas de AGCCs durante o desenvolvimento de suas infecções, ainda é incerto se tal produção acarreta em uma modulação imunológica de fato, ou se tais produtos são meramente gerados pelo metabolismo bacteriano sem grandes efeitos significativos no desenvolvimento e progresso das doenças.

Um exemplo desta produção de AGCCs por bactérias patogênicas pode ser visto na doença periodontal, um quadro de inflamação crônica gerado por uma gama de espécies bacterianas específica que inclui, entre outras, a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Estas bactérias são capazes de produzir diretamente altas concentrações dos AGCCs nas chamadas bolsas periodontais (AL-MUSHRIF *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2014). Além disso, durante a periodontite, a concentração dos AGCCs é ainda alterada indiretamente devido à modificação a composição da microbiota oral normal (processo de disbiose). Neste sentido, nós nos propusemos a estudar o papel dos AGCCs no contexto infeccioso em relação às possíveis modulações na resposta imunológica.

Assim, o modelo de câmara subcutânea (GENCO *et al.*, 1991) foi utilizado para gerar um ambiente isolado, mas passível às ações imunológicas, no interior de

camundongos C57BL/6, local onde foi possível estabelecer e manter uma monoinfecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Neste modelo, observamos que houve uma resposta imune local, autolimitada, com pico de migração leucocitária para o local de infecção 24 horas após inoculação da bactéria. Diferentemente do que é proposto na literatura em modelos de inflamação estéril *in vivo* e *in vitro* (LE POUL *et al.*, 2003; MASLOWSKI *et al.*, 2009; SINA *et al.*, 2009; VINOLO *et al.*, 2009b; VINOLO *et al.*, 2011c), durante a infecção na câmara subcutânea a presença dos AGCCs não alterou a migração celular. É bastante plausível que tal resultado esteja relacionado ao fato de que durante um quadro infeccioso diversas moléculas quimiotáticas são produzidas e liberadas em conjunto, as quais podem ter uma ação mais relevante que os AGCCs. Em nosso modelo, por exemplo, a própria bactéria inoculada viva já atua como um forte fator indutor do recrutamento leucocitário. Dentro da câmara, há a geração de uma mistura complexa de diversos quimioatraentes como, por exemplo, quimiocinas do hospedeiro (Cxcl1 e Cxcl2), bem como moléculas do sistema complemento e as próprias moléculas bacterianas como a molécula de lipopolisacarídeo (LPS) e o peptídeo formil-Met-Leu-Phe (fMLP), que atuam em conjunto, mascarando, ou se sobressaindo, a quimiotaxia induzida pelos ácidos graxos de cadeia curta. Nesse sentido já é descrito na literatura, por exemplo, que neutrófilos *in vitro* pré-estimulados com fMLP, IL-8 ou leucotrieno B4 tiveram pouca, ou nenhuma resposta, quando estimulados posteriormente com acetato ou propionato (LE POUL *et al.*, 2003). Este mesmo grupo demonstrou ainda que estas células apresentam uma dessensibilização dos receptores de AGCCs, uma vez que quando pré-estimuladas com acetato ou propionato, elas perdem temporariamente a capacidade de responder novamente aos mesmos ácidos graxos. Por outro lado, outros estudos nos mostram que o propionato, quando em conjunto com Cxcl1, pode potencializar o efeito quimioatraente desta quimiocina em neutrófilos, apresentando efeitos aditivos à quimiotaxia (SINA *et al.*, 2009). Desta maneira, nossos resultados indicam que o efeito quimioatraente dos ácidos graxos de cadeia curta se torna pouco significativo quando na presença de um processo infeccioso.

Embora não tenha havido diferença no número de leucócitos que migraram ao local da infecção, na presença ou ausência dos AGCCs, a função efetora destas células que adentraram a câmara foi modulada pela presença de tais metabólitos. O primeiro

indício deste efeito se deu por um aumento no número de bactérias viáveis no grupo dos animais que foram inoculados com o mix dos AGCCs. Neste contexto, é importante ressaltar que as hipóteses de que os AGCCs estariam modulando o crescimento bacteriano (como já descrito por HUANG *et al.*, 2011) ou mesmo de que eles apresentem efeitos citotóxicos em neutrófilos (como demonstrado por MASLOWSKI *et al.*, 2009; AOYAMA *et al.*, 2010) foram testadas e descartadas no modelo utilizado neste estudo.

Assim sendo, analisamos em seguida a capacidade dos neutrófilos em fagocitar as bactérias presentes no local de infecção. Classicamente os neutrófilos são tidos como as primeiras células a chegarem ao local e infecção, fato este corroborado por nossos achados, uma vez que os neutrófilos são o tipo celular predominante no interior da câmara ao longo de todo o tempo analisado. Ao chegarem ao local, sua principal função é a de fagocitar e destruir os micro-organismos antes que a infecção se espalhe, além de liberarem diversas citocinas e quimiocinas que irão orquestrar toda a resposta imune subsequente (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000). Os neutrófilos, como revisado por LEE *et al.* (2003) são capazes de internalizar partículas opsonizadas e não-opsonizadas, sendo essas reconhecidas pelos receptores de membrana Fc e o grupo das $\beta 2$ -integrinas que se ligam, respectivamente, aos anticorpos e a componentes do sistema complemento. O fagossomo formado, com os micro-organismos em seu interior, passa por um processo de maturação que inclui a aquisição de enzimas microbidas, ATPases e do complexo NADPH oxidase, fundindo-se posteriormente aos lisossomos dando origem aos fagolisossomos, estruturas que apresentam lúmen com pH ácido, o que favorece o funcionamento das enzimas lisossomais e sua atividade microbicida (LEE *et al.*, 2003).

A literatura acerca dos efeitos dos ácidos graxos de cadeia curta em neutrófilos se mostra bastante controversa. Diversos artigos nos mostram que os AGCCs diminuem, por exemplo, não somente a capacidade fagocítica de neutrófilos humanos e de ratos, mas também sua produção das espécies reativas de oxigênio, um dos principais mecanismos de eliminação dos micro-organismos fagocitados (LIU *et al.*, 2001; VINOLO *et al.*, 2009a). No entanto, o efeito inverso já foi igualmente relatado na literatura, no qual a produção de espécies reativas de oxigênio e a taxa de fagocitose foram aumentadas na presença dos AGCCs, efeitos estes que se mostraram

dependentes do receptor FFAR2 (MASLOWSKI *et al.*, 2009). Aparentemente, tais divergências se dão pelos diferentes estímulos a qual as células são submetidas, bem como pelo estado de ativação das células e/ou concentração dos AGCCs utilizados.

O presente estudo revela que os AGCCs presentes no local infeccioso reduzem a atividade fagocítica dos neutrófilos que chegam para combater os micro-organismos. Desta maneira, há um enfraquecimento da resposta imunológica, justificando a maior quantidade de bactérias viáveis vista anteriormente. Vemos, portanto, que a presença de altas concentrações de AGCCs pode favorecer um escape bacteriano em relação às ações do sistema imunológico. É interessante notar que neutrófilos humanos apresentam a mesma redução significativa na capacidade de fagocitar as bactérias *Aa in vitro* quando na presença dos AGCCs, o que corrobora com os nossos achados murinos *in vivo*.

Como dito acima, os neutrófilos são responsáveis não apenas por fagocitar e eliminar os micro-organismos invasores, mas também por secretar grandes quantidades de citocinas e outros mediadores inflamatórios que irão auxiliar as demais células da resposta imunológica (MANTOVANI *et al.*, 2011). Este fato pode ser visto em nossos resultados de análise do exsudato no tempo de 4 horas após a inoculação bacteriana, na qual a quantidade de citocinas, de maneira geral, aumentou cerca de 25 a 2000 vezes em relação às concentrações basais, já neste curto espaço de tempo. No entanto, neste período, a presença dos AGCCs não gerou diferenças significativas de produção das mesmas. Novamente, é provável que a bactéria em si seja um fator ativador tão potente às células imunes que seu efeito se sobressai em relação a outras moléculas ali presentes.

Observou-se, porém, que tal produção de citocinas não se mantém alta por muito tempo. A concentração dos mediadores inflamatórios no exsudato no tempo de 24 horas após inoculação da bactéria cai drasticamente em relação à quantidade observada no tempo de 4 horas. Neste tempo, porém, os AGCCs desencadearam uma redução ainda mais acentuada de TNF- α , IL-10 e Cxcl2, efeito esse que não foi observado para os demais mediadores analisados, demonstrando um efeito específico, e não generalizado, sobre a produção das citocinas. Vale ainda ressaltar que o mesmo efeito de redução na concentração de TNF- α foi observado, *in vitro*, com neutrófilos humanos.

TEDELIND *et al.* (2007) demonstraram efeitos anti-inflamatórios pela redução de TNF- α de neutrófilos humanos quando incubados, *in vitro*, com altas concentrações dos AGCCs (30 mM) em conjunto com agonistas de TLR4 (LPS). Por outro lado, MIRMONSEF *et al.* (2012) revelaram um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, por células mononucleadas humanas, especificamente na presença dos AGCCs e agonistas de TLR2 *in vitro*, mas não com agonistas de TLR4 (LPS). Resultados na modulação na produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios pelos AGCCs foram também descritos em macrófagos (COX *et al.*, 2009), células epiteliais (KIM *et al.*, 2013), células dendríticas (BERNDT *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012) e linfócitos (SINGH *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2015). Neste contexto, nossos resultados sugerem que a produção dos ácidos graxos de cadeia curta durante o desenvolvimento de infecções pode atenuar a produção de importantes citocinas pró-inflamatórias e quimionas por neutrófilos, levando não apenas a uma regulação imediata destas primeiras células que ali chegam, como também possivelmente de toda a atuação das células imunes posteriores. Embora não tenhamos analisado os mecanismos moleculares por trás da modulação na produção de citocinas pelos AGCCs, acreditamos que este efeito de redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α possa estar relacionado, ao menos parcialmente, com uma repressão na atuação de NF- κ B, como demonstrado nos experimentos de PARK *et al.* (2007).

Acreditamos também que os efeitos descritos neste estudo se relacionem com o contato direto das células imunes com os ácidos graxos de cadeia curta, tendo em vista que tais moléculas produzidas nos locais de infecção são encontradas em altas concentrações quando os leucócitos chegam ao local. Esta nossa hipótese se baseia nas observações de diversos estudos realizados exclusivamente no ambiente intestinal em condições homeostáticas. VELÁZQUEZ *et al.* (1997) demonstraram, por exemplo, que o butirato é capaz de induzir proliferação celular, mas somente em baixas concentrações, como observado nas criptas intestinais. É interessante notar que em condições fisiológicas, os AGCCs são produzidos pela microbiota intestinal em altas concentrações no cólon (70 – 140 mM), mas a concentração que de fato entra em contato com as células epiteliais intestinais (conolócitos) é muito menor. Isso se dá devido principalmente à camada de muco que se localiza sobre o epitélio (aproximadamente 100 μ m de largura), sendo ela constantemente renovada pela

produção das células caliciformes e do peristaltismo intestinal (FORSTNER e FORSTNER, 1994). Assim sendo, um gradiente de concentração de AGCCs é formado no sentido do lúmen às criptas intestinais, com alguns estudos relatando concentrações de 50 – 800 μM de butirato na base das criptas (SENGUPTA *et al.*, 2006).

Ainda neste sentido, DONOHOE *et al.* (2012) nos revela que o butirato é capaz de estimular a proliferação ou a apoptose das células epiteliais intestinais (IECs) dependendo da sua concentração. Esse AGCC promove a proliferação destas células quando em baixas concentrações, como no caso nas criptas intestinais onde há constante renovação tecidual, mas induz apoptose quando em concentrações mais elevadas, como ocorre nas células próximas ao lúmen, processo que auxilia o *turnover* celular. Tal divergência dos efeitos dos AGCCs já foi associada ao chamado ‘Efeito de Warburg’, estudado mais profundamente em carcinomas de cólon.

Um artigo recente nos revela que o propionato, em experimentos *in vitro*, foi capaz de induzir as células imunes de camundongos e humanas a um perfil anti-inflamatório frente a estímulos específicos como LPS ou determinadas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. No entanto, o tratamento *in vivo* com propionato, administrado tanto intraperitonealmente quanto por via oral (adicionado a água de beber), não foi suficiente para modificar a susceptibilidade de camundongos a diferentes quadros infecciosos com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, os principais agentes etiológicos de sepse em humanos (CIARLO *et al.*, 2016). PARK *et al.* (2015) nos mostra ainda que a presença de acetato e propionato em cultura promoveu a diferenciação de células T naíve em células Th1 e Th17. No entanto, a administração *in vivo* de acetato na água de beber de camundongos não foi capaz de modular a frequência e o número total de células Th1 e Th17 no cólon quando em condições fisiológicas sem infecção. Embora ambos os grupos não cite a diferença de concentração/contato dos AGCCs como uma causa direta das diferenças de respostas encontradas, trata-se de uma hipótese bem embasada que podemos inferir.

Dessa maneira, com base nos estudos intestinais expostos acima, nós extrapolamos tais observações e hipotetizamos que algo similar possa estar acontecendo em nosso modelo de infecção, isto é, nós acreditamos que as células

imunes, ao chegarem ao local de infecção, entram em contato direto com altas concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta que se encontram neste local e que estas condições reprimem diversas funções celulares como a produção de mediadores inflamatórios e a capacidade fagocítica. Com isso, há uma diminuição da resposta imunológica contra a bactéria, auxiliando no progresso do quadro infeccioso.

O receptor FFAR2 (ou GPR43, segundo a nomenclatura mais antiga) é o receptor de ácidos graxos de cadeia curta mais expresso em células mielóides, em especial em neutrófilos (LE POUL *et al.*, 2003; KARAKI *et al.*, 2008; COX *et al.*, 2009). Como revisado por ANG & DING (2016), o papel de FFAR2 no contexto inflamatório ainda é controverso na literatura. Alguns grupos relatam, por exemplo, que camundongos que não expressam tal receptor apresentam uma inflamação crônica exacerbada no cólon, com redução no recrutamento de neutrófilos, redução de células Treg e redução da expressão de IL-18 por células epiteliais intestinais, além de uma intensificação nos quadros de artrite e asma (MASLOWSKI *et al.*, 2009; MASUI *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2013; MACIA *et al.*, 2015). Em contrapartida, outros autores nos mostram que estes mesmos camundongos *knockout* para FFAR2 apresentam uma redução no quadro inflamatório crônico no cólon, com um aumento na migração de neutrófilos, além de redução na inflamação em modelo de gota (SINA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2015).

Interessante apontar, no entanto, que tais divergências são descritas não apenas em estudos de inflamação, mas também em alguns outros modelos experimentais. Diversos artigos apontam que a ausência do receptor FFAR2 leva a um aumento de marcadores de obesidade em camundongos (GE *et al.*, 2008; TOLHUST *et al.*, 2012; KIMURA *et al.*, 2013), resultados estes contrários aos observados por BJURSELL *et al.* (2011) na qual estes camundongos FFAR2^{-/-} apresentaram redução de gordura corporal mesmo quando sob dieta rica em gordura. Por fim, é possível ainda observar que o mesmo padrão de divergência é descrito acerca de outro receptor dos AGCCs, o FFAR3 (ou GPR41), com resultados mostrando que sua ausência acarretaria em atenuação de um quadro de colite crônica (KIM *et al.*, 2013), enquanto outros demonstram que sem ele, os animais apresentam um quadro de colite crônica mais acentuado (MASLOWSKI *et al.*, 2009). Vemos, portanto, que embora esteja clara a importância destes receptores em doenças crônicas inflamatórias, ainda há um

desacordo na literatura quanto ao seu papel no início e progressão destas condições. De acordo com ANG & DING (2016), diversos fatores podem contribuir para esta inconsistência vista nos camundongos FFAR2 *knockout*, como por exemplo os efeitos não-específicos que ainda não foram descritos nestes animais, os diferentes modelos de doenças utilizados, ou ainda diferenças nas linhagens de camundongos utilizadas nos cruzamentos.

Nossos resultados demonstram que em nosso modelo murino *in vivo*, a presença ou ausência do receptor FFAR2 não ocasiona mudanças significativas na quimiotaxia dos leucócitos para o local da infecção. No entanto, novamente acreditamos que durante o estabelecimento e o desenvolvimento da infecção, o efeito quimioatraente do FFAR2 via AGCCs (como descrito na literatura em outros modelos já citados) deva estar mascarado pela ativação de outros receptores celulares mais potentes como, por exemplo, TLR4 ativado pela presença de LPS bacteriano, entre outros. Embora não houveram efeitos significativos na migração celular, foi possível observar uma modulação na função efetora das células que migram ao local da infecção. Animais FFAR2^{-/-} apresentaram cerca de duas vezes mais bactérias viáveis no interior da câmara subcutânea quanto comparados aos animais FFAR2^{+/+}. Além disto, foi possível notar uma modulação específica na produção de IL-10 quando na ausência do receptor. Embora este presente estudo não tenha analisado as vias de sinalização do receptor FFAR2, a literatura recente nos sugere que os efeitos desencadeados por sua ativação podem envolver a participação do inflamassoma. Macia *et al.* (2015) demonstraram que a ativação de FFAR2 nas IECs, via ligação com os AGCCs, leva à ativação intracelular do complexo NLRP3 inflamassoma, cujo efeito é um aumento na integridade do epitélio. De maneira semelhante, Vieira *et al.* (2015) nos mostra que em macrófagos murinos a ativação do complexo NLRP3 inflamassoma é ao menos parcialmente dependente da ativação prévia de FFAR2.

Dessa maneira, este presente estudo sugere que a ativação do receptor FFAR2 seja relevante para as funções efetoras de neutrófilos em condições infecciosas, neste caso, uma infecção bacteriana causada por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uma vez que sua ausência acarreta em uma diminuição da resposta imunológica do hospedeiro contra os agentes infecciosos.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que os ácidos graxos de cadeia curta presentes nos locais de infecção não alteram o padrão de migração leucocitária, mas são capazes de atenuar a resposta imune contra a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por reduzirem a produção de importantes mediadores inflamatórios, bem como a capacidade fagocítica dos neutrófilos. Além disso, concluimos que estes metabólitos não alteram diretamente o crescimento bacteriano local. Por fim, foi possível concluir que o receptor FFAR2 é importante para a montagem da resposta imune contra a bactéria Aa. Desta maneira, estes resultados demonstram que o perfil dos AGCCs encontrado nos locais de infecção modula negativamente a resposta imune, favorecendo a sobrevivência da bactéria e, com isso, a manutenção e desenvolvimento do quadro infeccioso.

7. REFERÊNCIAS

Al-Mushrif, S.; Eley, A.; Jones, B. M. Inhibition of chemotaxis by organic acids from anaerobes may prevent a purulent response in bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* **2000**; 49; 1023–1030.

Ang, Z.; Ding, J.L. GPR41 and GPR43 in obesity and inflammation – Protective or causative? *Frontiers in Immunol* **2016**; 7:28.

Aoyama, M; Kotani, J; Usami, M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition.* **2010**; 26; 653–661.

Arpaia, N.; Campbell, C.; Fan, X.; Dikiy, S.; van der Veeken, J.; deRoos, P. et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **2013**; 504: 451–455.

Bäckhed, F.; Ley, R. E.; Sonnenburg, J. L.; Peterson, D. A.; Gordon, J. I.; Host-bacteria mutualism in the human intestine. *Science* **2005**, (80) 307.

Bailon, E.; Cueto-Sola, M.; Utrilla, P.; Rodriguez-Cabezas, M.E.; Garrido-Mesa, N.; Zarzuelo, A. et al. Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology* **2010**; 215: 863–873.

Berndt, B.E.; Zhang, M.; Owyang, S.Y.; Cole, T.S.; Wang, T.W.; Luther, J. et al. Butyrate increases IL-23 production by stimulated dendritic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2012**; 303: G1384–G1392.

Bjursell, M.; Admyre, T.; Göransson, M.; Marley, A.E.; Smith, D.M.; Oscarsson, J. et al. Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2011**; 300:E211–20. doi:10.1152/ajpendo.00229.2010.

Brestoff, J.R.; Artis, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol* **2013**; 14: 676–684.

Brown, A.J.; et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* **2003**; 278; 11312–11319.

Chakravarti, A.; Raquil, M.A.; Tessier, P.; Poubelle, P.E. Surface RANKL of Toll-like receptor 4–stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* **2009**; 114:1633–1644.

Chaudry, A.N.; Travers, P. J.; Yuenger, J.; Colletta, L.; Evans, P.; Zenilman, J. M.;Tummon, A. Analysis of vaginal acetic acid in patients undergoing treatment for bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* **2004**; 42; 5170–5175.

Ciarlo, E.; Heinonem, T.; Herderschee, J.; Fenwick, C.; Monbelli, M.; le Roy, D.; Roger, T. Impact of the microbial derived short chain fatty acid propionate on host susceptibility to bacterial and fungal infections *in vivo*. *Scientific Reports* **2016**; 6:37944. doi:10.1038/srep37944.

Corrêa, R. O.; Fachi, J. L.; Vieira, A.; Sato, F. T.; Vinolo, M. A. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology.* **2016**; 5; 73.

Cox, M.A.; Jackson, J.; Stanton, M.; Rojas-Triana, A.; Bober, L.; Lavery, M. et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol* **2009**; 15: 5549–5557.

Donohoe, D.R.; Collins, L.B.; Wali, A.; Bigler, R.; Sun, W.; Bultman, S.J. The warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell* **2012**; 48: 612–626.

Ebersole, J.L.; Kesavalu, L.; Schneider, S.L.; Machen, R.L. and Holt, S.C. Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. *Oral Dis* **1995**; 1, 115–128.

Fine, D.H.; Markowitz, K.; Furgang, D.; Fairlie, K.; Ferrandiz, J.; Nasri, C. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol* **2007**; 45:3859–3869.

Forstner, J.F.; and Forstner, G.G. Gastrointestinal mucus. *In Physiology of the Gastrointestinal Tract*, L.R. Johnson, ed. (New York: Raven), **1994** pp. 1255–1283

Furusawa, Y.; Obata, Y.; Fukuda, S.; Endo, T.A.; Nakato, G.; Takahashi, D. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **2013**; 504: 446–450.

Garlet G.P.; Cardoso, C.R.; Campanelli, A.P.; Ferreira, B.R.; Avila-Campos, M.J.; Cunha, F.Q. and Silva, J.S. The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* **2007**; 147, 128-138.

Ge, H.; Li, X.; Weiszmann, J.; Wang, P.; Baribault, H.; Chen, J.L. et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology* **2008**; 149:4519–26. doi:10.1210/en.2008-0059.

Genco C.A.; Cutler, C.W.; Kapczynski, D.; Maloney, K. and Arnold, R.R. A novel mouse model to study the virulence of and host response to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *Infect Immun* **1991**; 59, 1255-1263.

Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. **2015**; 15; 30-44.

Hooper, L.V.; Midtvedt, T.; Gordon, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* **2002**; 22: 283-307.

Hossain, Z.; Konishi, M.; Hosokawa, M. Takahashi, K. Effect of polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylcholine and phosphatidylserine on butyrate-induced growth inhibition, differentiation and apoptosis in Caco-2 cells. *Cell Biochem Funct* **2006**; 24(2): 159-165.

Huang, C.B.; Alimova, Y.; Myers, T.M. and Ebersole, J.L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* **2011**; 56, 650-654.

Johansson, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin: A Powerful Tool with Capacity to Cause Imbalance in the Host Inflammatory Response. *Toxins* **2011**, 3, 242-259; doi:10.3390/toxins3030242.

Jorth P.; Turner, K.H.; Gumus, P.; Nizam, N.; Buduneli, N. and Whiteley, M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio* **2014**; 5, e01012-01014.

Kachlany, S.C. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin: from Threat to Therapy. *J Dent Res* **2010**, 89(6): 561-570.

Karaki, S.; Tazoe, H.; Hayashi, H.; Kashiwabara, H.; Tooyama, K.; Suzuki, Y.; Kuwahara, A. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Hist* **2008**; 39:135 doi:10.1007/s10735-007-9145-y.

Katritch, V.; Cherezov, V.; Stevens, R.C. Structure-function of the G-protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2014**; 6,53: 531-556.

Kim, M. H.; Kang, S. G.; Park, J. H.; Yanagisawa, M.; Kim, C. H. Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*. **2013**; 145; 396–406.

Kimura, I.; Ozawa, K.; Inoue, D.; Imamura, T.; Kimura, K.; Maeda, T. et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun* **2013**; 4:1829. doi:10.1038/ncomms2852.

Koh, A.; de Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Backhed, F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* **2016**, 165(6): 1332-1345.

Korostoff, J.; Wang, J.F.; Kieba, I.; Miller, M.; Shenker, B.J.; Lally, E.T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect. Immun.* **1998**, 66:4474-4483.

Korostoff, J.; Yamaguchi, N.; Miller, M.; Kieba, I.; Lally, E.T. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Microb. Pathog.* **2000**, 29:267-278.

Le Poul, E.; Loison, C.; Struyf, S.; Springael, J.Y.; Lannoy, V.; Decobecq, M.E.; Brezillon, S.; Dupriez, V.; Vassart, G.; Van Damme, J.; et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* **2003**; 278; 25481–25489.

Lee, W.L.; Harrison, R.E.; Grinstein, S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **2003** 5 : 1299-1306.

Liu, Q.; Shimoyama, T.; Suzuki, K.; Umeda, T.; Nakaji, S.; Sugawara, K. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. *Scand. J. Gastroenterol.* **2001**; 36; 744–750.

Liu, L.; Li, L.; Min, J.; Wang, J.; Wu, H.; Zeng, Y. et al. Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Immunol* **2012**; 277: 66–73.

Louis, P.; Hold, G. L. & Flint, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews Microbiology* **2014**; 12, 661–672, doi: 10.1038/nrmicro3344.

Lu, R.; Meng, H.; Gao, X.; Xu, L.; Feng, X. Effect of non-surgical periodontal treatment on short chain fatty acid levels in gingival crevicular fluid of patients with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. **2014**; 49; 574-583.

Maa, M.C.; Chang, M.Y.; Hsieh, M.Y.; Chen, Y.J.; Yang, C.J.; Chen, Z.C. et al. Butyrate reduced lipopolysaccharide-mediated macrophage migration by suppression of Src enhancement and focal adhesion kinase activity. *J Nutr Biochem* **2010**; 21: 1186–1192.

Macia, L.; Tan, J.; Vieira, A.T.; Leach, K.; Stanley, D.; Luong, S. et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun* **2015**; 6: 6734.

Manal, M.; Chandrasekar, M. J. N.; Priya, J. G.; Nanjan, M. J. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorganic Chemistry* **2016**; (67) 18-42.

Mantovani, A.; Cassatella, M. A.; Costantini, C.; Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. **2011**; 11; 519-31.

Maslowski, K. M.; Vieira, A. T.; Ng, A.; Kranich, J.; Sierro, F.; Yu, D.; et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **2009**; 461; 1282–1286.

Masui, R.; Sasaki, M.; Funaki, Y.; Ogasawara, N.; Mizuno, M.; Iida, A.; et al. G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflamm Bowel Dis* **2013**; 19: 2848–56. doi:10.1097/01.MIB.0000435444.14860.ea.

Maynard, C.L.; Elson, C.O.; Hattin, R.D.; Weaver, C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* **2012**; 489: 231-241.

McNeil, N. I. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am J Clin Nutr* **1984**, 39:338-342.

Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, et al. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol* **2000**; 71: 981–88.

Millard, A. L.; Mertes, P. M.; Ittelet, D.; Villard, F.; Jeannesson, P.; Bernard, J. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol*. **2002**; 130: 245-255.

Mirmonsef, P.; Gilbert, D.; Zariffard, M. R.; Hamaker B. R.; Kaur, A.; Landay, A. L.; Spear, G. T. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* **2011**; 65:190–195.

Mirmonsef, P.; Zariffard, M. R.; Gilbert, D.; Makinde, H.; Landay, A. L.; Spear G. T. Short Chain Fatty Acids Induce Pro-Inflammatory Cytokine Production Alone And In Combination With Toll-like Receptor Ligands. *Am J Reprod Immunol*. **2012**; 67; 391–400.

Niederman, R.; Buyle-Bodin, Y.; Lu, B.Y.; Robinson, P.; Naleway, C. Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *J. Dent. Res.* **1997**;76; 575–579a.

Niederman, R.; Zhang, J.; Kashket, S. Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*. **1997**; 8; 269–290b.

Park, J.S.; Lee, E.J.; Lee, J.C.; Kim, W.K.; Kim, H.S. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: Involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Int. Immunopharmacol*. **2007**, 7, 70–77.

Park, J.; Kim, M.; Kang, S.G.; Jannasch, A.H.; Cooper, B.; Patterson, J. et al. Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. *Mucosal Immunol* **2015**; 8: 80–93.

Pihlstrom, B. L.; Michalowick, B. S.; Johnson, N. W. Periodontal diseases. *Seminars* 2005; (366): 1809-1820.

Pluznick, J.L.; Protzko, R.J.; Genorgyan, H.; Peterlin, Z.; Sipos, A.; Han, J. et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *PNAS* **2013**; 4410-4415, doi:10.1073/pnas.1215927110.

Pomare, E.W.; Branch, W.J. and Cummings, J.H. Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J Clin Invest* **1985**; 75, 1448-1454.

Purchiaroni, F.; Tortora, A.; Gabrielli, M. Bertucci, F.; Gigante, G.; Ianiro, G.; Ojetti, V.; Scarpellini, E.; Gasbarrini, A. The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2013**; 17:323-333.

Qiqiang, L.; Huanxin, M. and Xuejun, G. Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy. *J Periodontal Res* **2012**; 47, 740-749.

Rabelo, F. L. A.; Ropert, C.; Raos, M. G.; Bonjardim, C. A.; Gazzunelli, R. T.; Alvarez-Leite, J. I. Inhibition of ERK1/2 and CREB phosphorylation by caspase-dependent mechanism enhances apoptosis in a fibrosarcoma cell line treated with butyrate. *Biochem Bioph Res Co* **2003**, 303:968-972.

Raqib, R.; Sarker, P.; Bergman, P.; Ara, G.; Lindh, M.; Sack, D.A. et al. Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**; 103: 9178–9183.

Robinson PG. The significance and management of periodontal lesions in HIV infection. *Oral Dis* **2002**; 8 (suppl 2): 91–97

Rodrigues, H. G.; Sato, F. T.; Curi, R.; Vinolo, M. A. Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. *Eur J Pharmacol.* **2015**, 15;785:50-8.

Round, J. L.; Mazmarian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews* **2009**, 9:313-324.

Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R.; Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *bioRx-iv Cold Spring Harbor Labs Journal* **2016**.

Sekirov, I.; Russel, S. L.; Antunes, L. C. M.; Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews* **2010**, (90)3, 859-904.

Sengupta, S.; Muir, J.G.; and Gibson, P.R. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol* **2006**; 21, 209–218.

Simons, E. R. Measurement of phagocytosis and of the phagosomal environment in polymorphonuclear phagocytes by flow cytometry. Current protocols in cytometry/editorial board, J Paul Robinson, managing editor [*et al*]. **2010**; 9; 31.

Sina, C.; Gavrilova, O.; Forster, M.; Till, A.; Derer, S.; Hildebrand, F.; Raabe, B.; Chalaris, A.; Scheller, J.; Rehmann, A.; *et al*. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J. Immunol.* **2009**; 183; 7514–7522.

Singh, N.; Gurav, A.; Sivaprakasam, S.; Brady, E.; Padia, R.; Shi, H. *et al*. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* **2014**; 40: 128–139.

Smith, P.M.; Howitt, M.R.; Panikov, N.; Michaud, M.; Gallini, .CA.; Bohlooly, Y.M. *et al*. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **2013**; 341: 569–573.

Sommer, F.; Backhed, F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* **2013**; 11: 227–238.

Suzuki, T.; Yoshida, S.; Hara, H. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *The British Journal of Nutrition* **2008**, 100, 297.

Tan, J.; McKenzie, C.; Potamitis, M.; Thorburn, A. N.; Mackay, C. R.; Macia, L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Elsevier Inc.* **2014**; 121; 91-119.

Tan, T.; McKenzie, C.; Vuillermin, P. J.; Goverse, G.; Vinuesa, C.G. Mebius, R. E.; Macia, L.; Mackay, C. R. Dietary fiber and bacterial SCFA enhance oral tolerance and protect against food allergy through diverse cellular pathways. *Cell* **2016**, 15(12): 2809-2824.

Tedelind, S.; Westberg, F.; Kjerrulf, M.; Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2007**; 13; 2826–2832.

Tolhurst, G.; Heffron, H.; Lam, Y.S.; Parker, H.E.; Habib, A.M.; Diakogiannaki, E. et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the g-protein–coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **2012**; 61(2): 364-371.

Trompette, A.; Gollwitzer, E.S.; Yadava, K.; Sichelstiel, A.K.; Sprenger, N.; Ngom-Bru, C. et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* **2014**; 20: 159–166.

Uronis, J.M.; Muhlbauer, M.; Herfarth, H.H.; Rubinas, T.C.; Jones, G.S.; Jobin, C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS ONE* **2009**; 4(6): e6026. doi:10.1371/journal.pone.0006026.

van Winkelhoff A.J.; Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* **2000**; 20:122-135.

Velázquez, O.C.; Seto, R.W.; Bain, A.M.; Fisher, J.; and Rombeau, J.L. Deoxycholate inhibits in vivo butyrate-mediated BrDU labeling of the colonic crypt. *J Surg Res* **1997**; 69, 344–348

Vieira, A. Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta e seu receptor (GPR43) na função efetora de neutrófilos frente às bactérias anaeróbias. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. **2016**.

Vieira, A.T.; Macia, L.; Galvão, I.; Martins, F.S.; Canesso, M.C.; Amaral, F.A. et al. A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. *Arthritis Rheumatol* **2015**; 67:1646–56. doi:10.1002/art.39107.

Vijay-Kumar, M; Aitken, J.D.; Carvalho, F.A.; Cullender, T.C.; Mwangi, S.; Srinivasan, S. et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll-like receptor 5. *Science* **2010**; 328:5975, 228-231.

Vinolo, M. A.; Hatanaka, E.; Lambertucci, R.H.; Newsholme, P.; Curi, R. Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. *CellBiochem. Funct.* **2009**; 27; 48–55a.

Vinolo, M. A., et al. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin Sci (Lond)*. **2009**; 117; 331-338b.

Vinolo, M. A. R.; Rodrigues, H. G.; Hatanaka, E.; Sato, F. T.; Sampaio, S. C.; Curi, R. Suppressive effect of short-chain fatty acidson production of pro inflammatory Mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem*. **2011**; 22; 849-855a.

Vinolo, M. A. R.; Rodrigues, H. G.; Nachbar, R. T.; Curi, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*. **2011**; 3; 858-876b.

Vinolo, M. A. R; Ferguson, G. J.; Kulkarni, S.; Damoulakis, G.; Anderson, K.; Bohlooly-Y, M; Stephens, L.; Hawkins, P. T.; Curi, R. SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS ONE*. **2011**; 6c.

Vinolo, M.A.R.; Vinolo, M.A.; dos Santos, M.F.; Rodrigues, H.; Alves, V. et al. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Am Journ Physiol: Endocrin and Metab* **2012**; 15,303(2): E272-82.

Vogt, J.A.; Pencharz, P.B.; Wolever, T.M.S. L-Rhamnose increases serum propionate in humans. *Am J Clin Nutr* **2004**; 80,1:89-94.

Wang Q.; Jotwani, R.; Le, J.; Krauss, J.L.; Potempa, J.; Coventry, S.C. et al. Filifactor alocis infection and inflammatory responses in the mouse subcutaneous chamber model. *Infect Immun* **2014**; 82, 1205-1212.

Witko-Sarsat, V.; Rieu, P.; Descamps-Latscha, B.; Lesavre, P.; Halbwachs-Mecarelli. Neutrophils: molecules, functions and pathoohysiological aspects. *Lab Investig* **2000**; (80),5: 617-653.

Wolover, T.M.S.; Schrade, K.B.; Vogt, J.A.; Tsihlias, E.B.; McBurney, M.I. Do colonic short-chain fatty acids contribute to the long-term adaptation of blood lipids in subjects with type 2 diabetes consuming a high-fiber diet? *Am J Clin Nutr* **2002**; 75,6:1023-1030.

Wong, J. M.; de Souza, R.; Kendall, C. W.; Emam, A.; Jenkins, D. J. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*. **2006**; 40; 235.

Yu, X.; Shahir, A.M.; Sha, J.; Feng, Z.; Eapen, B.; Nithianantham, S.; et al. Short-chain fatty acids from periodontal pathogens suppress histone deacetylases, EZH2, and SUV39H1 to promote Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication. *Journal of virology* **2014**; 88, 4466-4479.

Zeng, X.; Sunkara, L.T.; Jiang, W.; Bible, M.; Carter, S.; Ma, X. et al. Induction of porcine host defense peptide gene expression by short-chain fatty acids and their analogs. *PLoS one* **2013**; 8: e72922.

8. ANEXO I



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta na resposta imune a bactérias anaeróbias in vivo" (protocolo nº 3230-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo / Renan Correa / Pamela Maximiano, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO ou CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de janeiro de 2014.

Campinas, 02 de janeiro de 2014.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta na resposta imune a bactérias anaeróbias in vivo (protocolo CEUA/UNICAMP nº 3230-1), de responsabilidade do Prof. Dr. Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo e Renan Correa, teve o título alterado para Participação dos ácidos graxos de cadeia curta e seu receptor (FFAR2) na resposta imune em modelo de monoinfecção por Aggregatibacter actinomycetemcomitans.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com os certificados emitidos originalmente pela CEUA/UNICAMP, sendo emitido em 02/01/2014.

Campinas, 19 de dezembro de 2016.

Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

9. ANEXO II



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Participação do receptor FFAR2/GPR43 na resposta a bactérias anaeróbias in vivo e in vitro", protocolo nº 4112-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo / José Luis Fachi / Aline Vieira / Érica Sernaglia / Renan Correa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 1º. de fevereiro de 2016.

Vigência do projeto: 03/2016-11/2017

Espécie/Linhagem: Camundongo Knockout / GPR43KO

No. de animais: 104

Idade/Peso: 02 meses / 25g

Sexo: machos

Origem: Biotérios de Animais Transgênicos, DGE/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 1º. de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

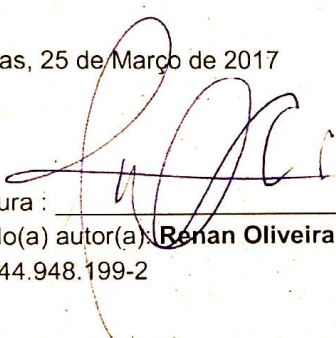
Fátima Alonso
Secretária Executiva

10. ANEXO III

Declaração

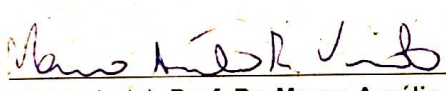
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Participação dos ácidos graxos de cadeia curta e seu receptor (FFAR2) na resposta imune em modelo de monoinfecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 25 de Março de 2017

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Renan Oliveira Corrêa**

RG n.º 44.948.199-2

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo**

RG n.º 33.269.470-7