



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriele Manamy Baba Rodrigues

Eixo intestino-pulmão:

Efeito do consumo de dieta cetogênica no infiltrado neutrofílico pulmonar e susceptibilidade à COVID-19.

São José do Rio Preto
2022

| | |
|-------|---|
| R696e | <p>Rodrigues, Gabriele Manamy Baba</p> <p>Eixo intestino-pulmão : Efeito do consumo de dieta cetogênica no infiltrado neutrofilico pulmonar e susceptibilidade à COVID-19 / Gabriele Manamy Baba Rodrigues. -- São José do Rio Preto, 2022 44 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Denise Morais da Fonseca Coorientadora: Marina Caçador Ayupe</p> <p>1. Imunologia. 2. Dieta de baixo carboidrato. 3. Infecção. I. Título.</p> |
|-------|---|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriele Manamy Baba Rodrigues

Eixo intestino-pulmão:

Efeito do consumo da dieta cetogênica no infiltrado neutrofílico pulmonar e susceptibilidade à COVID-19

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Denise Moraes da Fonseca
Instituto de Ciências Biomédicas - ICB/USP
Orientador

Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Dr^a. Érica Machado Salles
Instituto de Ciências Biomédicas - ICB/USP

São José do Rio Preto
12 de janeiro de 2022

Àqueles que, apesar de todas as adversidades, sempre acreditaram que eu seria capaz de atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vander e Michela, que estiveram aqui para me encorajar todas as vezes em que pensei em desistir, desde o começo da minha graduação. Sem vocês com certeza não chegaria até aqui. Aos meus irmãos, Maria Eduarda e Matheus, pois a maior motivação que tenho para seguir em frente é ser um bom exemplo para vocês.

À minha avó querida, Diva Rodrigues, e à minha madrinha, Vivien Rodrigues, a vontade de dar orgulho para vocês me fez seguir em frente e dar o meu melhor todo este tempo.

Ao meu amor e maior companheiro, Lucas Vinícius, que ouviu pacientemente todas as minhas reclamações e foi meu ponto de apoio nos momentos de maior angústia. Obrigada por estar ao meu lado por todo este tempo, sem nunca soltar a minha mão.

Aos meus colegas de classe, que trouxeram leveza para a barra pesada que é a graduação. Bruna Torrano, Marina Cambeiro, Stephanie Moraes, Yasmin Garcia e Ygor Neufeld, serei eternamente grata por todo o apoio que me deram durante esta jornada, todas as risadas e todos os momentos bons que compartilhamos.

À minha orientadora, professora doutora Denise Fonseca, à minha co-orientadora, Marina Caçador e a todos os integrantes do Laboratório de Imunologia das Mucosas, que me acolheram, me ensinaram tudo com paciência e foram extremamente atenciosos comigo.

RESUMO

Os anos de 2020 e 2021 têm sido marcados pela emergência de uma pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19. Desde a descoberta da doença, vários avanços foram feitos no sentido de se compreender a fisiopatogenia da COVID-19 e hoje sabe-se que a inflamação é um componente chave para as formas graves da doença. Durante a fase aguda da infecção ocorre uma tempestade de citocinas como IL-6, IL-17A, TNF e GM-CSF, associadas ao extenso recrutamento inflamatório, particularmente neutrofílico, encontrado em necropsias de tecido pulmonar de pacientes que vieram a óbito em decorrência da doença. Além de fatores associados à idade avançada, gestação e diversas comorbidades têm sido associadas à mortalidade por COVID -19, em particular a hipertensão, obesidade e o diabetes. Entretanto, não se sabe ainda a razão da alta taxa de morte por COVID-19 nestes grupos de pacientes, particularmente nos pacientes com diabetes e obesidade. No laboratório de Imunologia de Mucosas ICB/USP, estudamos como os componentes do sistema imunológico associado aos diferentes tecidos de mucosa comunicam-se entre si, em particular o eixo intestino-pulmão, e elaboram respostas diante de infecções, alterações na composição da microbiota e alterações na dieta. Neste projeto, avaliamos se o consumo de dieta cetogênica (utilizada amplamente por diabéticos e também por parte de indivíduos com obesidade) poderia influenciar na homeostase imunológica pulmonar e, conseqüentemente, no desfecho da COVID-19. Nossos resultados mostram que o tratamento com a dieta cetogênica levou a uma redução no ganho de peso dos animais, acompanhada de diminuição da glicemia dos animais e aumento da produção de corpos cetônicos. Encontramos também um aumento significativo no recrutamento de neutrófilos e de linfócitos $T\gamma\delta$ produtores de IL-17 para o compartimento vascular do pulmão, mas não para o parênquima tecidual. O recrutamento dos neutrófilos foi dependente da produção de IL-17. Para verificar se tais alterações poderiam induzir um impacto funcional na imunidade pulmonar, desafiamos os animais com SARS-CoV-2 e verificamos que o tratamento com dieta levou ao desenvolvimento de uma forma mais grave de COVID-19 com mortalidade de 50% e aumento de inflamação mononuclear e neutrofílica no parênquima pulmonar. Em conclusão, o tratamento com a dieta cetogênica influenciou a imunidade pulmonar e agravou a imunopatologia decorrente da infecção por SARS-CoV-2. Acreditamos que a dieta cetogênica

pode ser um dos fatores de risco para doença grave em indivíduos diabéticos ou obesos que fazem consumo deste tipo de alimentação.

Palavras-chave: COVID-19, infecção, eixo intestino-pulmão, dieta, mucosa, inflamação.

ABSTRACT

The years 2020 and 2021 have been marked by the emergence of a pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus, which causes the COVID-19 disease. Since the discovery of the disease, several advances have been made in order to understand the pathogenesis of COVID-19 and today it is known that inflammation is a key component of the severe forms of the disease. During the acute phase of the infection, there is a storm of cytokines such as IL-6, IL-17A, TNF and GM-CSF, associated with the extensive neutrophil recruitment found in necropsies of lung tissue in patients who died from the disease. In addition to factors associated with advanced age, several comorbidities have been associated with mortality from COVID-19, in particular diseases that promote increased expression of the angiotensin-converting enzyme (ACE2), which functions as a receptor for the entry of the virus. However, the reason for the high death rate due to COVID-19 in patients with other comorbidities, such as diabetes and obesity, is still unknown. The virus effectively infects the epithelium of the lung and intestinal mucosa and can reach organs such as the kidneys, liver and even the brain. In the Mucosal Immunology Laboratory ICB/USP, we studied how the components of the immune system associated with different mucosal tissues communicate with each other, in particular the intestine-lung axis, and elaborate responses to infections, changes in the composition of the microbiota and dietary changes. In this project, we evaluated whether the consumption of a ketogenic diet (used widely by diabetics and also by individuals with obesity) could influence pulmonary immune homeostasis and, consequently, the outcome of COVID-19. Our results show that the treatment with the ketogenic diet reduced the weight gain and the blood glycemia of the animals, as well as increased the production of ketone bodies. We also found a significant increase in the recruitment of neutrophils and IL-17-producing $T\gamma\delta$ lymphocytes to the vascular compartment of the lung, but not to the tissue parenchyma. Neutrophil recruitment was dependent on IL-17 production. To verify whether such changes could induce a functional impact on pulmonary immunity, we challenged the animals with SARS-CoV-2 and found that diet treatment led to the development of a more severe form of COVID-19 with a mortality rate of 50% and an increase in mononuclear and neutrophilic inflammation in the lung parenchyma. In conclusion, treatment with the ketogenic diet influenced pulmonary immunity and worsened immunopathology due to SARS-CoV-2 infection.

Keywords: COVID-19, infection, gut-lung axis, diet, mucosa, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Dosagem de glicemia e beta-hidroxibutirato no sangue dos camundongos alimentados com dieta padrão e cetogênica por 2 semanas | 19 |
| Figura 2 – Gel mostrando o tamanho das bandas de cada amostra | 21 |
| Figura 3 – Influência do tratamento com a dieta cetogênica no metabolismo dos camundongos | 26 |
| Figura 4 – Representação do processo de análise do painel de células mieloides | 28 |
| Figura 5 – Influência do tratamento com a dieta cetogênica na homeostase pulmonar | 29 |
| Figura 6 – Representação do processo de análise da produção de citocinas pelas células de origem linfóide | 30 |
| Figura 7 – Padrão de resposta imunológica pulmonar após o tratamento com a dieta cetogênica | 30 |
| Figura 8 – Efeito do tratamento com a dieta cetogênica no recrutamento de neutrófilos para o pulmão em camundongos deficientes do receptor da IL-17 | 32 |
| Figura 9 – Análise de peso e quantificação do escore clínico de camundongos infectados com SARS-CoV-2 | 34 |
| Figura 10 – Análise de histopatológica dos camundongos infectados com SARS-CoV-2 | 36 |
| Quadro 1 – Clones dos anticorpos utilizados. | 23 |
| Quadro 2 – Lista de parâmetros utilizados para avaliar escore clínico da doença | 24 |
| Quadro 3 – Contagem do escore de sinais clínicos apresentados pelos camundongos. | 34 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas controle e cetogênica

18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--|
| SARS-CoV-2 | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> |
| SARS | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| COVID-19 | <i>Coronavirus Disease 2019</i> |
| ACE2 | <i>Angiotensin Converting Enzyme-2</i> |
| TMPRSS2 | <i>Transmembrane Protease Serine 2</i> |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-1β | Interleucina β |
| TNFα | <i>Tumoral Necrosis Factor α</i> |
| IFN-1 | Interferon do tipo 1 |
| TCD8⁺ | Linfócitos T CD8 ⁺ |
| TCD4⁺ | Linfócitos T CD4 ⁺ |
| NETs | <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> |
| MERS-CoV | <i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| TAE | Tampão Tris-Acetato-EDTA |
| FITC | <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> |
| PMA | <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> |
| TCID50 | <i>Tissue Culture Infective Dose 50</i> |
| ICAM-1 | Molécula de Adesão Intercelular-1 |
| LFA-1 | Antígeno 1 Associado à Função Linfocitária |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------------|---------------------------|
| mg | Miligrama |
| Kg | Quilograma |
| μL | Microlitro |
| g | Grama |
| °C | Celsius |
| RCF | Força centrífuga relativa |
| V | Volt |
| μg | Micrograma |
| rpm | Rotações por minuto |
| μm | Micrômetro |
| ng | Nanograma |
| h | Hora |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 | Objetivos específicos | 18 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 | Camundongos | 18 |
| 3.2 | Composição das dietas utilizadas | 18 |
| 3.3 | Medição da glicemia e dos corpos cetônicos | 19 |
| 3.4 | Genotipagem | 19 |
| 3.4.1 | Extração de DNA | 19 |
| 3.4.2 | PCR convencional | 20 |
| 3.4.3 | Eletroforese em gel de agarose | 20 |
| 3.5 | Extração de células do pulmão | 21 |
| 3.6 | Imunofenotipagem de células do pulmão por citometria de fluxo | 22 |
| 3.6.1 | Marcação de superfície | 22 |
| 3.6.2 | Marcação intracelular | 22 |
| 3.6.3 | Marcação intranuclear | 23 |
| 3.7 | Infecção por SARS-CoV-2 | 23 |
| 3.8 | Histopatologia | 24 |
| 3.9 | Análises estatísticas | 24 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 4.1 | Parâmetros metabólicos alterados pelo tratamento com a dieta cetogênica | 25 |
| 4.2 | Efeito da dieta cetogênica na homeostase pulmonar | 26 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.3 | Contribuição da produção de IL-17 no recrutamento de neutrófilos para a vasculatura pulmonar após consumo de dieta cetogênica | 28 |
| 4.4 | Impacto do tratamento com a dieta cetogênica na infecção por SARS-CoV-2 | 31 |
| 5 | CONCLUSÕES | 36 |
| | REFERÊNCIAS | 37 |
| | ANEXO A - Ficha Técnica Dieta Cetogênica High Fat | 40 |
| | ANEXO B - Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais | 41 |

1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus são um grupo de vírus pertencentes à família *Coronaviridae* e apenas 7 espécies são conhecidas por infectar humanos. No final do ano de 2019, um novo coronavírus, o SARS-CoV-2, iniciou um surto de pneumonia infecciosa e síndrome respiratória aguda grave (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*) na cidade de Wuhan, na China. Em 2020, a doença chamada de COVID-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*) foi considerada como uma pandemia devido à sua rápida transmissão e os dados mais atuais (11 de janeiro, 2022) já reportam mais de 300 milhões de casos e mais de 5 milhões de mortes (WHO CORONAVIRUS (COVID-19) DASHBOARD, 2021). Os sintomas da COVID-19 variam de manifestações leves, como febre e tosse seca, a formas graves, como a síndrome do desconforto respiratório agudo, falência de múltiplos órgãos e morte (ZHU et al., 2020).

A primeira etapa da infecção pelo SARS-CoV-2 é a interação entre a glicoproteína de membrana *Spike* (S) do vírus e a enzima conversora de angiotensina (ACE2, do inglês *Angiotensin Converting Enzyme-2*), expressa por diversas células hospedeiras, como células epiteliais, endoteliais e pneumócitos pulmonares (QI et al., 2020; LOVREN et al., 2008). O processo de fusão do vírus se completa quando a proteína *Spike* se liga à célula hospedeira através de proteases de serina, como a TMPRSS2 (SHULLA et al., 2011; HOFFMAN et al., 2020). A partir de então, o vírus invade a célula, passa a se replicar e ativa a resposta imune inata e a adaptativa.

Após o reconhecimento do vírus pelo sistema imune inato, uma resposta inflamatória é desencadeada, com produção de citocinas como a IL-6, IL-1 β ou TNF α , levando ao recrutamento e ativação das células do sistema imune inato e a um quadro inflamatório acentuado (SCHETT; STICHERLING; NEURATH, 2020). Quando as células do epitélio respiratório entram em contato com o vírus, ocorre a ativação de receptores da imunidade inata e levando à produção de interferon do tipo 1 (IFN-I) pelas células epiteliais, que leva o organismo a um estado antiviral, onde as células do sistema imune passam a produzir fatores que bloqueiam a transcrição viral, diminuindo a liberação do vírus ou levando à sua eliminação (KASUGA et al., 2021). No entanto, o vírus SARS-CoV-2 possui diversos

mecanismos que inibem o seu reconhecimento mediado por IFN-I, de modo que a resposta imune adaptativa se faz necessária para o controle do patógeno (FELSENSTEIN et al., 2020).

A resposta imune específica manifesta-se por volta de uma a duas semanas após a infecção por meio da ativação do sistema imune adaptativo, que ocorre quando células apresentadoras de antígenos capturam e apresentam fragmentos peptídicos do vírus para linfócitos TCD8⁺, que mata as células infectadas e o vírus, e TCD4⁺, que além de auxiliar as células B na produção de anticorpos que neutralizam o vírus, ainda auxilia na ativação da resposta de outras células do sistema imune (SAMADDAR et al., 2020). Se este sistema funciona de maneira rápida e regulada, a infecção pode ser controlada sem que haja o desenvolvimento de sequelas decorrentes do excesso de inflamação tecidual que comprometam o funcionamento de órgãos vitais, como os pulmões. Entretanto, em uma parcela significativa dos indivíduos infectados a infecção progride agudamente e desencadeia a um quadro de inflamação sistêmica caracterizada pela produção sistêmica de mediadores inflamatórios, a chamada tempestade de citocinas, e o acometimento funcional de vários órgãos (TAY et al., 2020; SAMADDAR et al.). Uma parcela significativa destes pacientes progride para formas graves fatais da doença.

Em quadros graves da COVID-19, os indivíduos apresentam linfopenia acentuada, que foi apontada em alguns estudos como consequência da morte de linfócitos TCD4⁺, seja por meio da infecção direta pelo vírus, por ação nos folículos linfóides ou até mesmo por induzir aumento de marcadores de exaustão dos linfócitos (ZHENG et al., 2020). Associado à linfopenia, pacientes graves apresentam intenso infiltrado neutrofílico no tecido pulmonar, acompanhado de aumento de liberação de NETs (do inglês, *Neutrophil-Derived Extracellular Traps*) (BARNES et al., 2020). Estudos já associaram este quadro ao desenvolvimento de doenças trombóticas nas formas graves da doença, visto que as NETs podem levar a ativação de fatores de coagulação no endotélio vascular (MAGRO et al., 2020; DOLHNIKOFF et al., 2020). Desta forma, a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias de intervenção e pode auxiliar na identificação de grupos de maior risco para desfechos graves, como as gestantes, os idosos e os pacientes portadores de comorbidades.

Ao decorrer da pandemia de SARS-CoV-2, diversos estudos mostraram que pacientes com comorbidades associadas, como diabetes, hipertensão, doença respiratória crônica ou insuficiência renal e cardíaca, possuem maior chance de desenvolver formas graves da doença, podendo até chegar a óbito (NIKOLICH-ZUGICH et al., 2020). Uma meta-análise realizada por um estudo chinês, que incluiu 1527 pacientes da infecção original de Wuhan, mostrou que 9,7% dos casos graves ocorreram em pacientes diabéticos, seguido de pacientes hipertensos e de portadores de doenças cardio-cerebrovasculares (17,1% e 16,4%, respectivamente) (LI et al., 2020).

Neste contexto, alguns estudos enfatizam a relação entre a infecção viral e a diabetes e esta doença é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de formas graves e letais de COVID-19. Um estudo utilizando um modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 2, susceptível à infecção por MERS-CoV (coronavírus causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio), mostrou aumento dos níveis de IL-17A, dano pulmonar e agravamento da doença (KULCSAR et al., 2019). Em outro estudo, camundongos diabéticos apresentaram aumento da atividade da ACE2 no pâncreas, sugerindo que pacientes portadores da diabetes *mellitus* poderiam ser mais suscetíveis à infecção por coronavírus (ROCA-HO et al., 2017). Um trabalho mais recente, associou o aumento dos níveis glicêmicos de pacientes diabéticos com o aumento da atividade inflamatória de monócitos e macrófagos e o desenvolvimento de COVID-19 grave (CODO et al., 2020).

Um fenômeno comum entre os diabéticos é a cetoacidose, caracterizada pelo aumento dos níveis de corpos cetônicos na circulação, decorrente da alimentação com uma dieta com baixo teor de carboidratos e alto teor de gordura. Esta dieta é chamada de dieta cetogênica. Além dos diabéticos, a dieta cetogênica também é amplamente utilizada para o tratamento de pacientes que apresentam obesidade ou que querem perder peso rapidamente. Por conta de seus metabólitos possuírem efeitos anticonvulsivos e neuroprotetores, esta dieta também já foi reconhecida durante muito tempo no tratamento da epilepsia (FREEMAN; KOSSOFF, 2010; RAHMAN et al., 2014). Em diabéticos, a dieta cetogênica melhora os parâmetros metabólicos, como triglicerídeos e glicemia (HUSSAIN et al., 2012). As alterações provocadas pela dieta cetogênica foram associadas à composição da microbiota intestinal, com predominância de espécies benéficas, como *Akkermansia muciniphila* (Verrumicrobia) e

Lactobacillus (Firmicutes), em detrimento daquelas pró-inflamatórias, como *Desulfovibrio* (Filo Proteobacteria) e *Turicibacter* (Firmicutes) (MA et al., 2018).

Apesar dos efeitos da dieta cetogênica sobre a composição da microbiota serem parcialmente conhecidos, pouco se sabe sobre seu efeito na resposta imunológica intestinal e tampouco na mucosa pulmonar. No Laboratório de Imunologia de Mucosas do ICB/USP, estudamos o efeito do consumo de dietas desbalanceadas, como a dieta cetogênica, na homeostase imunológica dos tecidos de mucosa, em particular o intestino e o pulmão. Um estudo publicado em 2019 mostrou que, após serem alimentados com a dieta cetogênica por uma semana, camundongos infectados pelo vírus influenza apresentaram redução da carga viral e proteção da barreira pulmonar, com envolvimento de células TCR $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 (GOLDBERG et al., 2019). Contudo, esta resposta pode não ser protetora contra a patologia que ocorre na COVID-19, visto que neste cenário a inflamação parece contribuir para a morbidade e a produção de IL-17 na mucosa pulmonar pode exacerbar o recrutamento neutrofílico para este tecido.

Neste contexto, evidências mostram que os neutrófilos são recrutados para o tecido pulmonar diante de infecções como influenza, SARS-CoV-1, MERS-CoV e, especialmente em SARS-CoV-2, podendo contribuir para o aumento da inflamação e dano no tecido pulmonar (BARNES et al., 2020; LIU et al., 2020). De fato, foi encontrado em necropsias de pacientes que vieram a óbito por COVID-19, um intenso infiltrado neutrofílico nos capilares do pulmão, bem como deposição de fibrina e mucosite na traqueia (BARNES et al., 2020; FOX et al., 2020).

Diante deste cenário, ainda são escassos os estudos que relacionam a influência da ingestão de dietas desbalanceadas na patogênese da COVID-19. Hipotetizamos que um dos fatores associados com o aumento de morbidade de indivíduos diabéticos durante a infecção por SARS-CoV-2 seria o efeito da dieta cetogênica sobre a homeostase imunológica pulmonar. Acreditamos que o entendimento do efeito de dietas desbalanceadas sobre a imunidade pulmonar pode abrir novas perspectivas para o manejo da COVID-19 e de outras doenças inflamatórias que acometem a mucosa respiratória.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do consumo de dieta cetogênica na homeostase imunológica pulmonar e no desfecho da COVID-19 em modelo murino.

2.1 Objetivo específico

- 1- Avaliar o efeito do tratamento com dieta cetogênica na homeostase imunológica na mucosa pulmonar;
- 2 – Estudar a contribuição da IL-17 sobre os efeitos do consumo da dieta cetogênica na homeostase imunológica da mucosa pulmonar;
- 3- Avaliar o efeito do consumo de dieta cetogênica na sobrevida e imunopatologia pós-infecção pelo vírus SARS-CoV-2 em camundongos transgênicos para a expressão de h-ACE2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Camundongos fêmeas C57BL/6 com 8 semanas de idade obtidos do biotério do Departamento de Imunologia (ICB/USP) foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo (ICB- USP). Camundongos IL-17R KO (deficientes para o receptor de IL-17) foram gentilmente cedidos pelo professor José Carlos Alves Filho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e camundongos transgênicos h-ACE2 (B6.Cg-Tg (K18-ACE2) 2 Prln/J) originalmente comprados da The Jackson Laboratory, foram gentilmente cedidos pelo professor Marco Aurélio Ramirez Vinolo da Universidade Estadual de Campinas. Os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos, com ciclos alternados 12h de claro/escuro e alimentados com ração padrão e especial e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Universidade de São Paulo, protocolo nº 9410211019_[UDMO1]. A eutanásia dos animais foi realizada por meio de dose excessiva de anestésico, cetamina (375 mg/Kg) e xilazina (37,5 mg/Kg).

Para realizar os experimentos deste projeto, utilizamos diferentes linhagens de camundongos conforme descrito a seguir:

- Os camundongos C57BL/6 foram utilizados para verificar o efeito do consumo de dieta cetogênica no metabolismo e na homeostase pulmonar dos camundongos;
- Os camundongos IL-17R KO foram utilizados a fim de verificar se as alterações na homeostase pulmonar causadas pelo consumo de dieta cetogênica eram dependentes da presença do receptor da IL-17;
- Os camundongos transgênicos h-ACE2 (B6.Cg-Tg (K18-ACE2) 2 Prln/J) foram utilizados a fim de mimetizar a infecção por SARS-CoV-2 em humanos.

3.2 Composição das dietas utilizadas

Após 8 semanas de idade, quando atingiram 20g de peso corpóreo, os camundongos foram tratados com as dietas controle (RHOSTER) ou com a dieta cetogênica (RHOSTER RH 195150) (**Tabela 1**).

| Dietas | Controle | Cetogênica |
|----------------|----------|------------|
| Composição (%) | | |
| Carboidratos | 63,9 | 0,5 |
| Lípídeos | 17,2 | 67,4 |
| Proteínas | 18,8 | 15,3 |

Tabela 1: Composição das dietas controle e cetogênica. Porcentagem dos componentes principais das dietas utilizadas. A composição detalhada da dieta cetogênica se encontra no **Anexo A**.

3.3 Medição da glicemia e dos corpos cetônicos

No dia da realização do experimento, o sangue dos camundongos C57BL/6 foi coletado através de punção na veia caudal com lanceta para a medição dos corpos cetônicos, que foi realizada utilizando fitas do kit Freestyle Optium Cetona (**Esquema 1**).



Figura 1: Dosagem de glicemia e beta-hidroxibutirato no sangue dos camundongos alimentados com dieta padrão e cetogênica por 2 semanas. Foi realizado jejum de 6 e 12 horas para dosagem dos níveis glicêmicos e de beta-hidroxibutirato no sangue dos grupos estudados.

3.4 Genotipagem dos camundongos

3.4.1 Extração de DNA

Após o cruzamento entre camundongos C57BL/6 e h-ACE2, realizamos a genotipagem da prole para identificar animais hemizigotos para a expressão do gene da proteína ACE2 humana. Para tal, amostras de 3mm da extremidade caudal dos camundongos h-ACE2 foram incubadas a 55°C overnight, juntamente com 500µL de Tail Buffer e 5µL proteinase K. Após a estabilização à temperatura ambiente, foram adicionados às amostras 500µL de fenol/clorofórmio (Invitrogen). A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Ao fim do período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 13000 RCF/10 minutos/em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fase superior da suspensão foi transferida para microtubos contendo 1000µL de etanol 100% (Merck), os tubos foram homogeneizados por inversão, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e centrifugados novamente a 13000 RCF/10 minutos. Após

o descarte do sobrenadante, 1000 μ L de etanol 100% foram adicionados às amostras que foram novamente homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 13000 RCF/10 minutos. Ao final da última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* formados secaram por 10 minutos, depois foram ressuspensos em 200 μ L de água miliQ livre de RNase e DNase (Invitrogen) e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente.

3.4.2 PCR convencional

Em dois microtubos foram adicionados água miliQ (12 μ L), PCR Buffer 1X (2 μ L), DMSO 5% (Merck) (1 μ L), dNTP 0,2mM (Invitrogen)(0,4 μ L), MgCl₂(Invitrogen) 1,5mM (0,6 μ L), primer 53438 (reação A e B) (sequência 5'-3' CAC CAA CAC AGT TTC CCA AC) 0,5 uM (1 μ L), primer 53439 (reação A) (sequência 5'-3' AAG TTG GAG AAG ATG CTG AAA GA) 0,5 uM (1 μ L), primer 53437 (reação B) (sequência 5'-3' GAC CCC TGA GGG TTT CAT ATA G) 0,5 uM (1 μ L), Taq polimerase 0,05U/ μ L (0,2 μ L) e o DNA (1 μ L). Os mix foram colocados em termociclador (ThermoFisher) seguindo as seguintes etapas: 94°C/3 minutos (etapa 1), 94°C/20 segundos, (etapa 2), 65°C/15 segundos (etapa 3), 68°C/10 segundos (etapa 4), repetir as etapas 2-4 por 10 ciclos (etapa 5), 94°C/15 segundos, (etapa 6), 60°C/15 segundos (etapa 7), 72°C/10 segundos (etapa 8), repetindo-se as etapas 6-8 por 28 ciclos (etapa 9), 72°C/2 minutos (etapa 10) e por fim, as amostras foram deixadas descansar a 10°C (etapa 11).

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose (Kasvi) foi preparado a 2% com tampão TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA) (Invitrogen) 1X e aquecido por 2 minutos. O volume evaporado foi completado com água destilada e a mistura foi colocada na cuba para solidificar. Os *amplicons* da reação A foram homogeneizados com os da reação B e foi adicionado a eles 10 μ L de *loading buffer*, a fim de obter uma solução final a 1X. 10-15 μ L da solução final foi adicionada a cada poço do gel, que correu a 100V/40 minutos. Ao final, a amostra foi fotografada com incidência de luz ultravioleta. Os animais portadores do transgene foram selecionados com base no tamanho da banda (**Figura 2**).

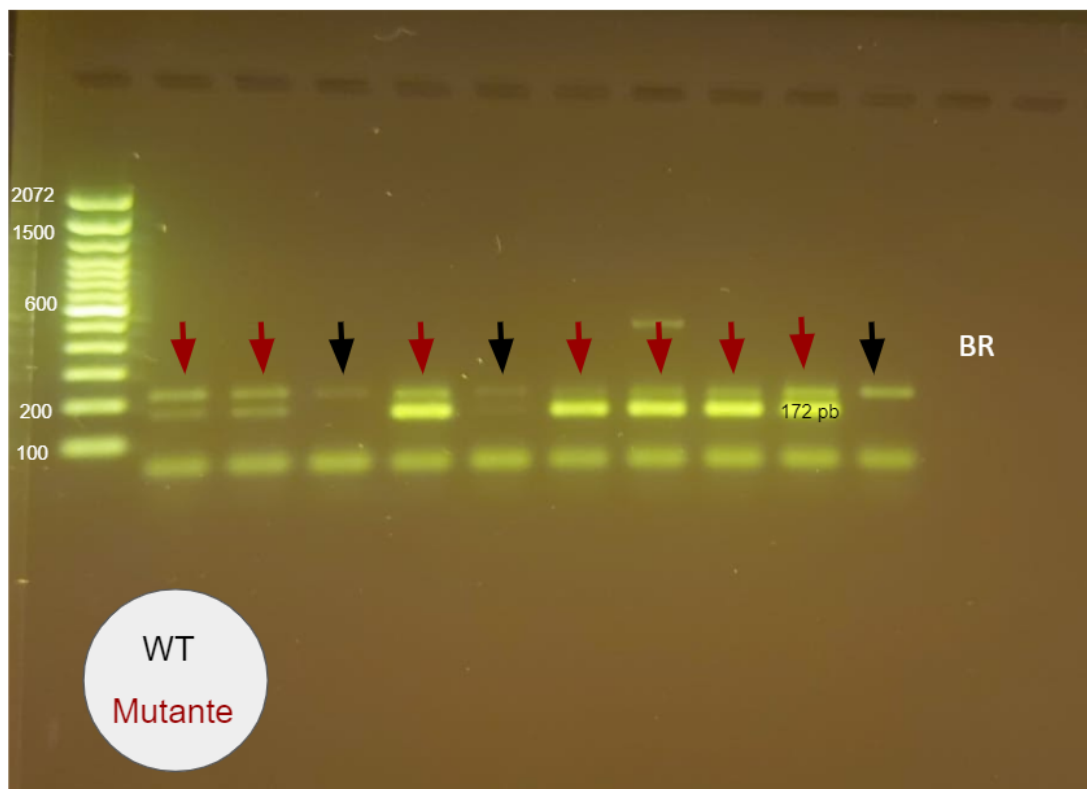


Figura 2: Gel mostrando o tamanho das bandas de cada amostra. Mutante com 170 bp e Wildtype (WT) com 221 bp e branco.

3.5 Extração de células do pulmão

Após o tratamento com as diferentes dietas, os animais foram injetados com 3 μ g de anticorpo anti-CD45 (Biolegend–clone 30-F11) conjugado com o fluorocromo FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*) em 200 μ L de solução salina por via intravenosa para a marcação da fração vascular do infiltrado celular pulmonar. Após 3 minutos, os animais foram eutanasiados, perfundidos com 40 mL de PBS 1X e tiveram seus pulmões retirados e mantidos em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) incompleto (Sigma). As células do tecido pulmonar foram isoladas após o pulmão ser picotado em pequenos pedaços, digerido em solução de digestão (1ml/pulmão) contendo 0,5mg/mL de DNase (Sigma) e 1mg/mL de Colagenase IV (Sigma) e mantido na incubadora por 30 minutos/37°C/180 rpm. Ao sair da incubadora, o conteúdo foi ressuspensão em RPMI com 3% de SFB (Soro Fetal Bovino – Sigma) para interromper a reação de digestão, filtrado em cell strainer (BD-Biosciences) de 70 μ m e centrifugado por 6 minutos/4°C/1600 rpm. As células obtidas foram ressuspensas em meio RPMI contendo: 2% Penicilina/estreptomicina (HyClone) 2% L-Glutamina (Sigma-Aldrich), 1% Piruvato (Sigma-Aldrich), 0,25%

β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) e 5% SFB (Sigma-Aldrich) e 1% aminoácidos não essenciais (HyClone). As amostras foram mantidas em gelo e para a contagem da viabilidade das células foi utilizada a câmara de Neubauer e o corante *Trypan Blue*. Após a contagem, as células foram marcadas para a realização da citometria de fluxo.

3.6 Imunofenotipagem de células do pulmão por Citometria de Fluxo

3.6.1 Marcação de superfície

Um a 2×10^6 células obtidas da suspensão celular foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo “U”, lavadas 2 vezes com HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Hyclone) por meio de centrifugação por 3 minutos/ 4°C /1600 rpm e coradas com o corante de viabilidade celular LIVE/DEAD *Fixable Dead Cell Stains* (1:1000) diluído em HBSS, por 20 minutos/ 4°C , protegido da luz. As células foram lavadas novamente por 2 vezes com solução de PBS 1x contendo 2% de SFB (3 minutos/ 4°C /1600 rpm), ressuspensas em $30\mu\text{L}$ da mistura de anticorpos de superfície, anticorpos anti-receptor para porção Fc de anticorpos (anti-CD16/32 – Bioxcell, clone 2.4G2) e incubadas por 30 minutos/ 4°C , sem luz. Ao final da incubação, as células foram novamente lavadas 2 vezes com PBS 1x contendo 2% de SFB, ressuspensas em 2% de paraformaldeído (Sigma) e incubadas por 20 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas mais 2 vezes com solução de PBS 1x com 2% de SFB e ressuspensas nesta mesma solução. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD-LSR-Fortessa X20 e as análises foram realizadas através do software FlowJo®.

3.6.2 Marcação intracelular

Para a marcação de citocinas, 5×10^5 células da suspensão celular foram transferidas em quadruplicatas para uma placa de 96 poços de fundo chato e incubadas por 4 horas/ 37°C /5% CO_2 com solução de estímulo ($100\mu\text{L}$ /poço) contendo: meio RPMI completo, 500 ng/mL de ionomicina (Sigma), 50 ng/mL PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma) e 1 μL /mL brefeldina A/golgi plug (BD Biosciences). Após o período de incubação, o procedimento de marcação celular foi iniciado. As células foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo “U”, centrifugadas por 3 minutos/ 4°C /1600 rpm e lavadas por 2 vezes com HBSS (Hyclone). Posteriormente, as células foram coradas com o corante de

viabilidade celular LIVE/DEAD (1:500) (LD Thermo Fisher Scientific) por 20 minutos/4°C, sem luz. As células foram lavadas 2 vezes com solução PBS 1x com 2% de SFB, ressuspensas em 30µL da mistura de anticorpos de superfície, em conjunto com anticorpos anti-receptor para porção Fc de anticorpos (anti-CD16/32) e incubadas por 30 minutos a 4°C, sem luz. Ao final da incubação, as células foram centrifugadas, lavadas por 2 vezes com tampão de permeabilização Perm Wash (BD-biosciences), ressuspensas na mistura de citocinas (anticorpos intracelulares) e incubadas por 1h/4°C, sem luz. Quadro 1 mostra o clone dos anticorpos utilizados.

| Anticorpo | Fluorocromo | Fabricante | Clone |
|-----------|--------------|------------|----------|
| CD45 | FITC, BV 650 | Biolegend | 30-F11 |
| CD11b | BV 605 | Biolegend | M1/70 |
| Ly6G | PE-TR | BD | 1A8 |
| Thy 1.2 | BV 785 | Biolegend | H12 |
| IL-17 | Percp | Invitrogen | eBio17B7 |
| TCRγδ | PE-TR | BD | GL3 |

Quadro 1: Clones dos anticorpos utilizados.

3.6.3 Marcação intranuclear

Em uma placa de 96 poços de fundo “U” foram adicionadas 2×10^6 células obtidas a partir da suspensão celular, as células foram centrifugadas por 2 minutos/4°C/1600 rpm, lavadas 2 vezes com HBSS e ressuspensas em corante de viabilidade celular LIVE/DEAD *Fixable Dead Cell Stains* (1:1000) diluído em HBSS. Após serem incubadas por 20 minutos a 4°C, protegidas da luz, as amostras foram lavadas 2 vezes com mistura de PBS 1X com 2% de SFB, centrifugadas por 3 minutos/4°C/1600 rpm e ressuspensas em 30 µL do mix de anticorpos de superfície, contendo anticorpos anti-receptor para porção Fc de anticorpos (anti-CD16/32) e incubadas por 30 minutos/4°C, protegidas da luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com mistura de PBS 1X com 2% SFB, ressuspensas em tampão de fixação (Ebio Science) (100 µL/poço) e incubadas por 60 minutos a 4°C, protegidas da luz.

3.7 Infecção por SARS-CoV-2

Camundongos transgênicos h-ACE2 (B6.Cg-Tg (K18-ACE2) 2Prlmn/J) com 12 semanas de idade, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP) e tratados por 3 semanas com dieta padrão ou cetogênica. Após esse período, os animais foram transportados para o laboratório de nível de biossegurança 3 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. Após uma semana de aclimatação, os animais foram anestesiados com a associação de cetamina (Syntec) (100 mg/kg) e xilazina (Syntec) (10 mg/kg), aplicados por via intraperitoneal. Em seguida foi inoculado, por via intranasal, 40uL de meio DMEM com 2% de SFB contendo $2,5 \times 10^4$ TCID₅₀ (Dose Infectante para Cultura de Tecido) de SARS-CoV-2 [SARS-CoV-2 – Brazil/SP BR1/2020, gentilmente cedido pela Prof. Dra. Ana Márcia de Sá Guimarães do Laboratório De Virologia Clínica e Molecular do ICB-USP. Após a inoculação, os animais foram mantidos sobre bolsas térmicas aquecidas até retornarem da anestesia. Os animais foram avaliados clinicamente (peso, atividade, mobilidade, postura, pelame e olhos) e após 7 dias de infecção os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico para coleta das amostras (**Quadro 2**).

| Parâmetro | Avaliação | Escore |
|----------------------------|--------------------|--------|
| Peso corporal | 0% de perda | 0 |
| | 1 a 5% de perda | 1 |
| | 6 a 10% de perda | 2 |
| | 11 a 15% de perda | 3 |
| | 16 a 20% de perda | 4 |
| | > de 20% de perda | 5 |
| Postura e aparência | Sem piloericação | 0 |
| | Piloericação | 1 |
| Atividade | Ativo | 0 |
| | Atividade moderada | 1 |
| | Pouca atividade | 2 |
| | Imobilidade | 3 |
| Abertura dos olhos | Normal | 0 |
| | Fechamento lento | 1 |
| | Fechados | 2 |
| Responsividade a estímulos | Normal | 0 |
| | Moderada | 1 |
| | Baixa | 2 |
| Respiração | Normal | 0 |
| | Acelerada | 1 |

Adaptado de MOREAU (Am. J. Trop. Med. Hyg, 2020) e KUMARI (Viruses, 2021).

Quadro 2: Parâmetros utilizados para avaliar o escore clínico da doença

3.8 Histopatologia

O lóbulo esquerdo do pulmão foi coletado, fixado por 24h em Formol tamponado 10% e processado e blocos de parafina pelo setor de histologia do Departamento de Imunologia

ICB/USP. Cortes de 5µm de tecido foram corados com Hematoxilina e Eosina para posterior análise em microscopia de luz.

3.9 Análise estatísticas

Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa Prism 5.0. Inicialmente, foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros metabólicos alterados pelo tratamento com a dieta cetogênica

Atualmente, o uso de dietas desbalanceadas tem se tornado cada vez mais frequente na população como, por exemplo, dietas com alto teor de lipídeos, por exemplo, que levam ao sobrepeso e à obesidade, promovendo o aumento da inflamação sistêmica (PENDYALA et al., 2012). Além disso, muitas pessoas fazem uso de dietas restritivas, como aquela conhecida como “*low-carb*” ou cetogênica, caracterizada por possuir baixo teor de carboidratos. Essa dieta é amplamente utilizada por pessoas que procuram perder peso ou para o tratamento de algumas doenças, como a diabetes e a epilepsia infantil refratária a terapias.

Com o intuito de mimetizar o que acontece com um adulto saudável que passa a ingerir a dieta cetogênica com a finalidade de perder peso, utilizamos camundongos adultos, com 8 semanas de idade (DASHTI et al., 2007), os tratamos com a dieta cetogênica durante 4 semanas e comparamos seu peso com o de camundongos também adultos tratados com uma dieta padrão. Ao final das 4 semanas, foi observado que camundongos tratados com a dieta cetogênica apresentaram um aumento significativo do corpo cetônico β -hidroxibutirato no sangue em comparação com os camundongos tratados com a dieta padrão (Figura 3A).

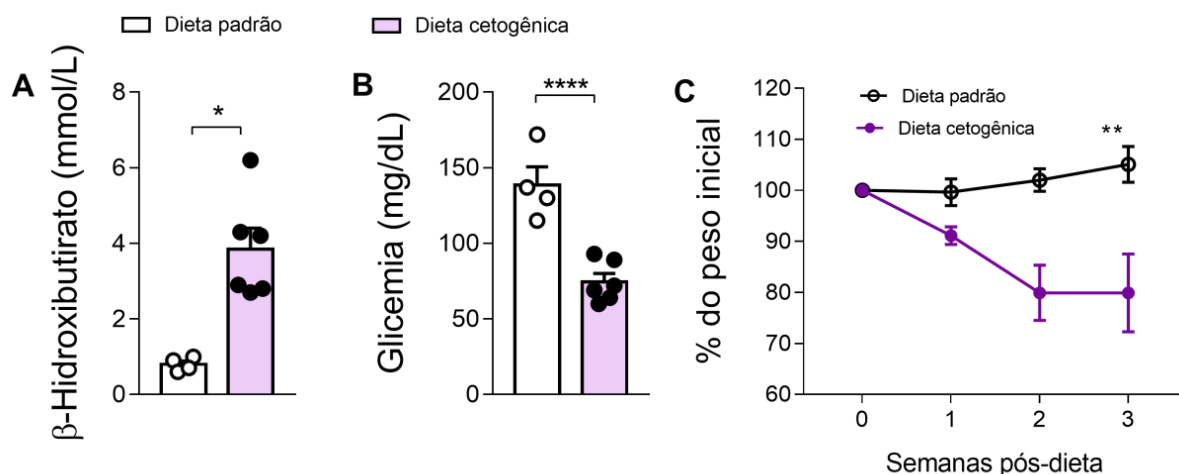


Figura 3. Parâmetros metabólicos alterados pelo tratamento com a dieta cetogênica. Camundongos C57BL/6 com 8 semanas de idade foram tratados com dieta padrão e dieta cetogênica por 4 semanas. Durante as semanas de dieta, obteve-se (A) quantidade de β -hidroxibutirato no sangue, (B) a concentração de glicose no sangue e (C) a alteração do peso representada pela porcentagem em relação ao peso inicial (n=4-5 animais por grupo). Resultado de um experimento independente reproduzido uma vez. *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001.

Em contrapartida, a glicemia de jejum destes animais diminuiu significativamente em comparação com os animais alimentados com dieta padrão (Figura 3B). Também foi

observada uma redução significativa na porcentagem de peso ganho em relação ao peso inicial dos animais tratados com a dieta cetogênica quando comparados com os camundongos que receberam a dieta padrão (**Figura 3C**).

Em síntese, estes dados mostram que o consumo da dieta cetogênica foi capaz de alterar o metabolismo dos animais, levando ao aumento do uso de lipídios para obtenção de energia, com conseqüente redução no peso em conseqüência do reduzido consumo de carboidratos.

4.2 Efeito da dieta cetogênica na homeostase pulmonar

Existem estudos que comprovam que a dieta cetogênica influencia a composição da microbiota intestinal (SWIDSINSKI et al., 2017). Contudo, os mecanismos pelos quais se dão estas alterações causadas pela dieta ainda são pouco explorados. Alguns estudos investigam os efeitos do tratamento com a dieta cetogênica em células do sistema imunológico, mostrando que esta pode reduzir a quantidade de bactérias do gênero *Bifidobacteria* no intestino e levar a redução de células Th17 inflamatórias (ANG et al., 2020). Outro estudo, realizado por Goldberg et al., mostrou que camundongos alimentados com a dieta cetogênica exibiram expansão de células TCR $\gamma\delta$ que apresentavam um perfil protetor no tecido adiposo (GOLDBERG et al., 2020). Entretanto, todos estes estudos abordam a influência da microbiota alterada pela dieta sobre a composição do sistema imune intestinal e não o contrário, ou seja, o efeito direto da dieta sobre o sistema imunológico da mucosa intestinal e até mesmo de tecidos distais, como a mucosa pulmonar.

Tendo em vista que a dieta cetogênica é capaz de influenciar a microbiota e, conseqüentemente, o sistema imune intestinal e considerando que existe um eixo de comunicação entre o intestino e diferentes tecidos (BUDDEN et al., 2017; MARSLAND; TROMPETTE; GOLLWITZER, 2015), buscamos entender como a dieta influencia na imunidade pulmonar. Para isso, foi realizada uma caracterização fenotípica do infiltrado celular no pulmão dos animais para a identificação de alguns subtipos celulares que poderiam ser influenciados pela dieta.

Como o pulmão é um órgão altamente vascularizado e possui um compartimento imunológico importante associado à vasculatura tecidual, utilizamos um protocolo de marcação das células aderidas à vasculatura para diferenciá-las dos leucócitos presentes no parênquima pulmonar. Para tal, através da realização de uma perfusão pulmonar foi possível

eliminar as células da vasculatura que circundam o tecido, mas não as que permanecem aderidas ao endotélio. A fim de realizar a separação das células do parênquima pulmonar daquelas aderidas à vasculatura, os camundongos foram injetados por via intravenosa com anticorpo anti-CD45 marcado com o fluorocromo FITC e eutanasiados após 3 minutos da aplicação. Em seguida, o tecido pulmonar foi processado e seguiu para análise das populações de células do sistema imunológico por citometria de fluxo (**Esquema 2**). Através deste procedimento foi possível separar as células que se encontram no parênquima daquelas aderidas à vasculatura.

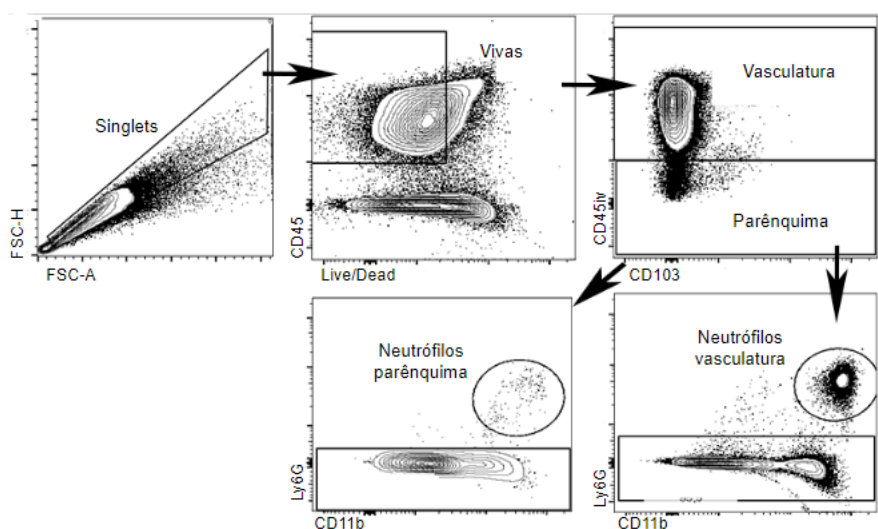


Figura 4. Representação do processo de análise do painel de células mieloides para identificação de neutrófilos teciduais ou associados à vasculatura. As células foram adquiridas por citometria de fluxo e analisadas com auxílio do programa FLOWJO V1.7.1.

Apesar de não apresentarem diferença significativa no número absoluto de leucócitos, o que nos chamou atenção foi o aumento significativo tanto na frequência quanto no número total de neutrófilos aderidos à vasculatura pulmonar, mas não no parênquima, dos camundongos tratados com a dieta cetogênica, quando comparados aos camundongos alimentados com a dieta padrão (**Figura 3 A-B**). Resultados obtidos no Laboratório de Imunologia de Mucosas mostram que esta alteração é restrita ao pulmão, não sendo encontrada em nenhum outro órgão do corpo (Ayupe et al, manuscrito em preparo). Dessa forma, acreditamos que a dieta cetogênica possa de alguma forma induzir uma alteração inflamatória na vasculatura pulmonar, que leva ao recrutamento dos neutrófilos para este tecido, levando a um quadro de inflamação persistente que não se estende ao parênquima pulmonar.

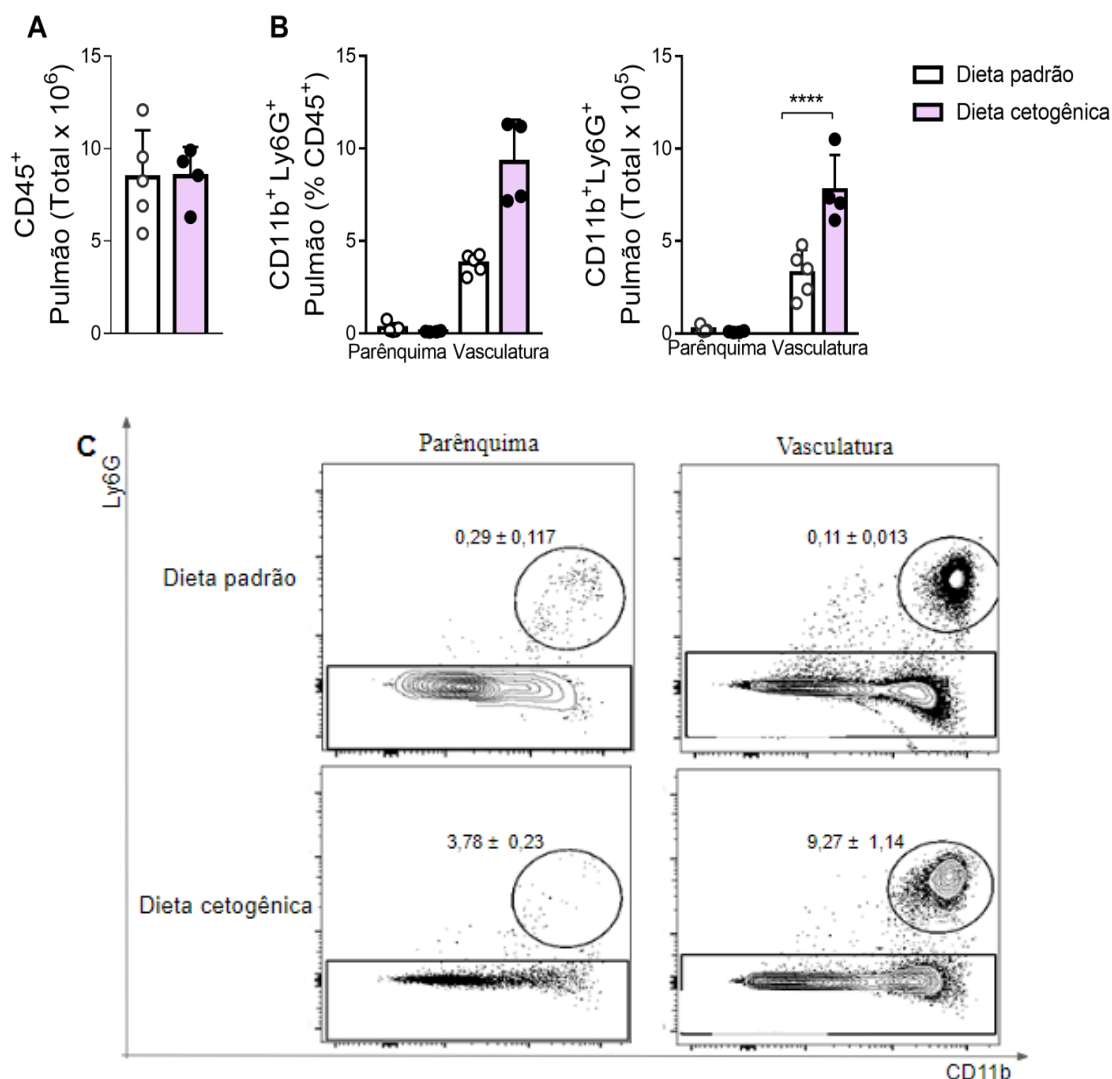


Figura 5. Influência do tratamento com a dieta cetogênica na homeostase pulmonar. Camundongos C57BL/6 com 8 semanas de idade foram tratados com dieta padrão e dieta cetogênica por 4 semanas. Após a eutanásia com dose excessiva de anestésico obteve-se (A) número total de leucócitos no pulmão, (B) frequência e número total de neutrófilos e (C) *dotplots* representativos da média da porcentagem de neutrófilos no pulmão dos camundongos tratados com a dieta padrão e cetogênica. (n=4-5 animais por grupo). Estratégia de análise descrita no esquema 2. As barras representam as médias. Resultado de um experimento reproduzido três vezes *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001.

4.3 Contribuição da produção de IL-17 no recrutamento de neutrófilos para a vasculatura pulmonar após consumo de dieta cetogênica

Na etapa seguinte do trabalho, avaliamos possíveis mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos para a vasculatura pulmonar após o tratamento com a dieta. Sabe-se que a citocina IL-17 participa das vias de recrutamento de neutrófilos para tecidos inflamados (BARNES et al., 2020; LIU et al., 2020). Diante disso, o próximo passo do estudo foi verificar se a dieta cetogênica influencia na proporção de células produtoras de IL-17 no tecido pulmonar dos camundongos.

A **figura 7** mostra que camundongos alimentados com a dieta cetogênica, apresentaram aumento significativo na porcentagem e no número total de células T que expressam $\text{TCR}\gamma\delta$ produtoras de IL-17 na porção vascular do pulmão, mas não no parênquima (**Figura 7A-B**), sugerindo que o aumento no infiltrado neutrofílico no tecido pulmonar possa estar relacionado à produção de IL-17. Não encontramos alterações na produção de IL-17 por outras populações celulares, como linfócitos T CD4^+ , T CD8^+ ou células linfóides inatas (dados não mostrados).

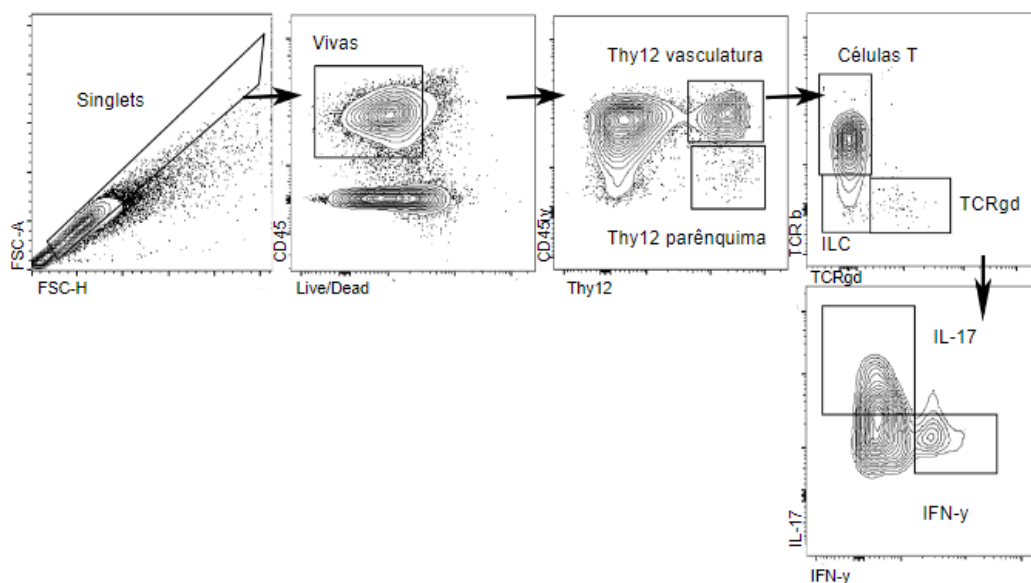


Figura 6. Representação do processo de análise da produção de citocinas pelas células de origem linfóide. As células foram adquiridas por citometria de fluxo e analisadas com auxílio do programa FLOWJO LV10.7.1.

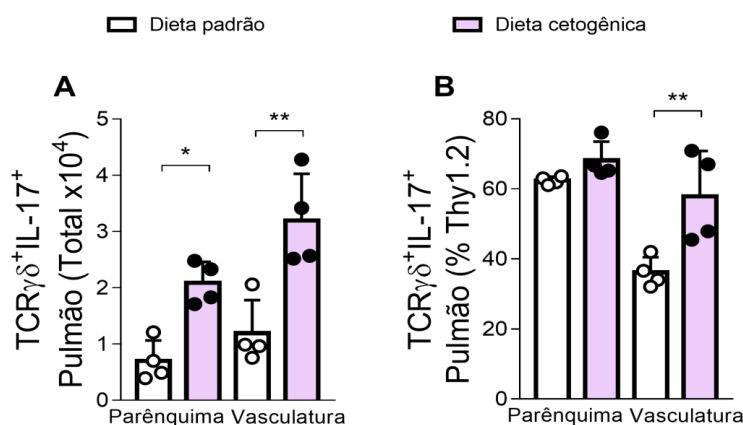


Figura 7. Produção de IL-17 por células T $\text{TCR}\gamma\delta^+$ após o tratamento com a dieta cetogênica. Camundongos C57BL/6 com 8 semanas de idade foram tratados com as dietas padrão e cetogênica por 4 semanas. Após a eutanásia com dose excessiva de anestésico foi realizado (A) porcentagem e número total de células $\text{TCR}\gamma\delta^+$ IL17 $^+$ no parênquima e na vasculatura do pulmão. Estratégia de análise descrita no esquema 3 (n=4 animais por grupo). As barras representam a média. Resultados reproduzidos uma vez. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Em outro experimento realizado no Laboratório de Imunologia das Mucosas, foi observado que a dieta cetogênica induziu a produção de IL-17 pelas células $\text{TCR}\gamma\delta$ na porção

proximal do intestino delgado, o que nos faz pensar que essas células desempenham função importante no recrutamento de neutrófilos para essa porção do intestino delgado. De acordo a literatura, as células T que expressam TCR $\gamma\delta$ possuem a capacidade de migrar para diferentes tecidos, deste modo, essas células podem estar sendo ativadas no intestino, por conta das alterações na microbiota causadas após a administração da dieta, e migrando para o tecido pulmonar (LIM et al., 2008; MANN et al., 2012). Os resultados obtidos sugerem que os neutrófilos e as células TCR $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 presentes na vasculatura do pulmão respondem rapidamente às mudanças nas quantidades de carboidrato e lipídeos da dieta ou a aos corpos cetônicos produzidos em decorrência da ingestão desta dieta.

Estudos mostram que as células endoteliais estão entre as primeiras células que reagem ao aumento desses metabólitos na circulação, gerando um estresse oxidativo e aumento de espécies reativas de oxigênio (KANIKARLA-MARIE & JAIN, 2015). De acordo com outro estudo, o aumento de corpos cetônicos está relacionado ao aumento de moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), no endotélio, e LFA-1 (antígeno 1 associado à função linfocitária), em monócitos (RAINS & JAIN, 2011). Há a possibilidade de este processo ocorrer de maneira similar em neutrófilos, no entanto, como o aumento destas células ocorreu apenas na vasculatura do pulmão de camundongos tratados com a dieta cetogênica, é possível que haja outros fatores associados a este fenômeno.

De acordo com a literatura, um dos substratos utilizados pelo tecido pulmonar para obter energia na ausência de glicose são os corpos cetônicos (NEWMAN & VERDIN, 2014). Acredita-se que estes metabólitos podem influenciar o balanço de neutrófilos na vasculatura do pulmão, mas ainda não há certeza de qual mecanismo está por trás dessa associação. Há a possibilidade de os corpos cetônicos atuarem diretamente na vasculatura, de maneira a aumentar a expressão de moléculas de adesão, ou favorecer a ativação e o recrutamento de linfócitos TCR $\gamma\delta$, que por sua vez, favorecem o recrutamento de neutrófilos via IL-17. Há ainda a possibilidade de que este efeito ocorra via alterações na microbiota comensal.

Após identificar o aumento de neutrófilos e células TCR $\gamma\delta$ produtores de IL-17 na vasculatura do pulmão de animais tratados com a dieta cetogênica, prosseguimos para a análise da fenotipagem de animais deficientes para o receptor de IL-17, a fim de entender se o influxo de neutrófilos no pulmão era dependente de IL-17. Primeiramente, avaliou-se o efeito do tratamento com a dieta cetogênica nos animais deficientes para o receptor de IL-17. Apesar

de não apresentarem diferença significativa no número total de leucócitos no pulmão, os animais WT alimentados com a dieta cetogênica apresentaram aumento significativo na frequência e no número total de neutrófilos quando comparados aos animais alimentados com a dieta padrão (**Figura 8**), assim como verificado anteriormente. No entanto, os animais deficientes do receptor da IL-17 (IL-17R KO) apresentaram redução tanto na frequência quanto no número absoluto de neutrófilos em comparação com os animais WT alimentados com a dieta cetogênica (**Figura 8B**). Estes resultados mostram que a IL-17, possivelmente produzida por linfócitos $T\gamma\delta$, participa do recrutamento de neutrófilos para o compartimento vascular pulmonar após o tratamento com a dieta cetogênica. Ainda é necessário elucidar como o consumo da dieta cetogênica leva ao recrutamento de células $T\gamma\delta$ produtoras de IL-17 especificamente para a vasculatura pulmonar. Temos algumas hipóteses que serão estudadas em etapas futuras, incluindo (1) a possibilidade de que metabólitos produzidos pela dieta possam alterar a composição da microbiota pulmonar que atuaria como sinalizadora para o recrutamento ou diferenciação de $T\gamma\delta$ IL-17⁺ ou ainda (2) a possibilidade de que estas células $T\gamma\delta$ sejam ativadas na mucosa intestinal e adquiram a capacidade de migrar para outros tecidos de mucosa, como o pulmão.

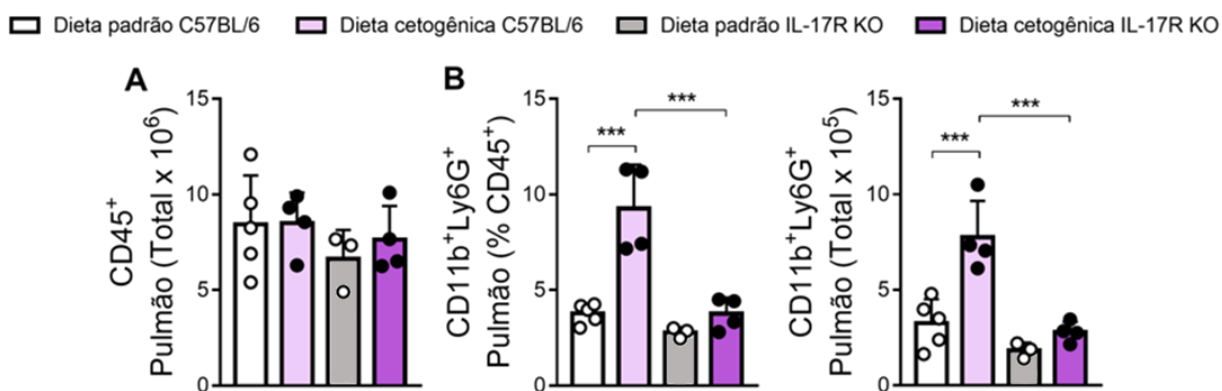


Figura 8. Contribuição da IL-17 para o recrutamento de neutrófilos para o pulmão após o consumo de dieta cetogênica. Camundongos C57BL/6 e camundongos deficientes do receptor da IL-17 com 8 semanas de idade foram tratados com as dietas padrão e cetogênica por 4 semanas. Após a eutanásia com dose excessiva de anestésico, obteve-se (A) número total de leucócitos viáveis CD45⁺, (B) porcentagem e número total de neutrófilos na vasculatura do pulmão. Estratégia de análise descrita no esquema 3. (n=3-4-5 animais por grupo). As barras representam a média. Resultados reproduzidos uma vez. *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001.

4.4 Impacto do tratamento com a dieta cetogênica na infecção por SARS-CoV-2

Embora tenhamos encontrado alterações inflamatórias importantes no pulmão dos animais alimentados com a dieta cetogênica, os animais não exibiram sinais de que estavam desenvolvendo algum tipo de doença inflamatória espontaneamente. Por isso, na etapa

seguinte do projeto avaliamos o impacto funcional das alterações imunológicas pós-tratamento com a dieta sobre a imunidade pulmonar, em particular a imunidade antiviral em modelo de COVID-19.

Ainda não existem estudos que mostram a relação entre a dieta e casos graves de infecção por SARS-CoV-2. Diante disto, sabe-se que a cetoacidose, decorrente da alimentação com baixo teor de carboidrato e alta ingestão de gordura, é um fenômeno comum entre diabéticos, que são um dos principais grupos de risco para desenvolver formas graves da COVID-19 (WANG et al., 2021). Conforme descrito anteriormente, a dieta cetogênica induz intensa neutrofilia no pulmão dos animais e estudos prévios mostram que os neutrófilos geralmente são recrutados para o pulmão diante de infecções como MERS-CoV, SARS-CoV-1 e, especialmente SARS-CoV-2, contribuindo para o agravamento da inflamação causando danos ao tecido pulmonar (LIU et al., 2020; BARNES et al., 2020). Diante deste contexto, hipotetizamos que a dieta cetogênica poderia agravar a infecção pelo SARS-CoV-2

A **figura 9** mostra que apesar de não apresentarem diferença significativa entre os grupos infectados, tanto camundongos transgênicos alimentados com a dieta padrão quanto a cetogênica apresentaram redução na porcentagem de peso após a infecção pelo SARS-CoV-2. (**Figura 9A**). Com relação a avaliação clínica dos animais, os animais infectados tratados com a dieta controle, uma parcela (50%) dos animais passou a apresentar sinais clínicos leves a partir do sétimo dia de infecção, mas não houve mortalidade de animais neste período. Em contrapartida, animais tratados com a dieta cetogênica e infectados, apresentaram pouca mobilidade e olhos cerrados, comparado aos animais alimentados com a dieta padrão e infectados, a partir do sexto dia e culminando no sétimo dia após a infecção (**Quadro 3 e Figura 9**). Além disso, verificamos a mortalidade de 50% dos animais do grupo que consumiu dieta cetogênica até o sétimo dia de infecção, quando optamos por encerrar o experimento devido à alta morbidade dos animais infectados no grupo que consumiu a dieta cetogênica (**Quadro 3**). Os outros parâmetros analisados não apresentaram diferença significativa entre os grupos (**Figura 9B**).

Esses dados indicam que o peso não foi um parâmetro determinante de diferença entre os grupos alimentados com a dieta padrão e cetogênica após a infecção pelo SARS-CoV-2. Contudo, sugerimos, pelos dados obtidos nos sinais clínicos, que os animais alimentados com a dieta cetogênica apresentaram piora do quadro infeccioso.

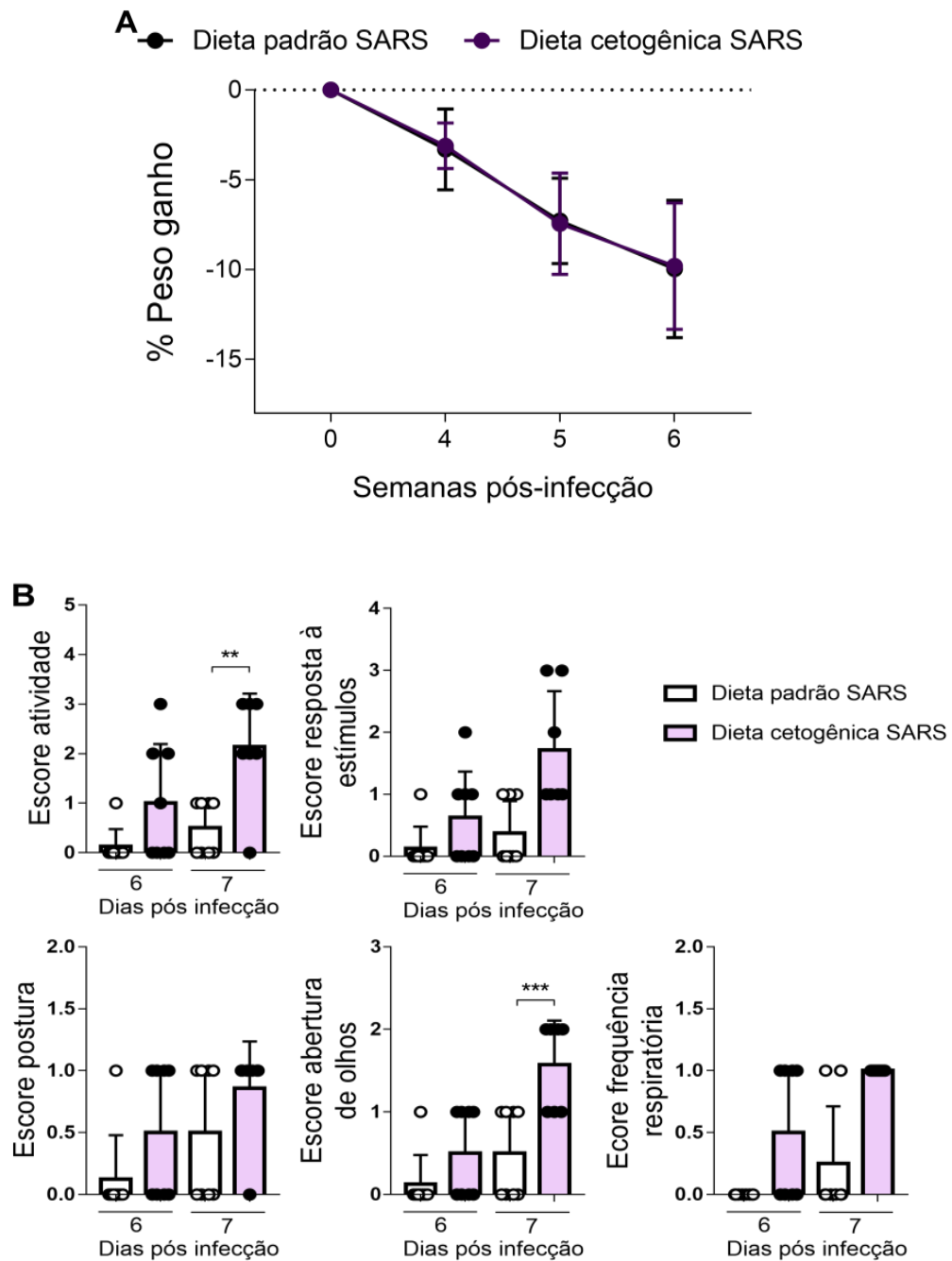


Figura 9. Análise de peso e quantificação do escore clínico de camundongos infectados com SARS-CoV-2. Camundongos transgênicos que expressam a proteína ACE2 foram alimentados com dieta padrão ou cetogênica durante 4 semanas. Após esse período, os animais foram infectados e foram infectados com 2×10^4 TCID₅₀ do vírus SARS-CoV-2 por via intranasal e os sinais clínicos (**Quadro 2**) foram acompanhados: alteração de peso durante a infecção (A), frequência respiratória, atividade e mobilidade dos animais (abertura de olhos, postura e resposta a estímulos). (n=8 animais pr grupo).

| Grupos | Sinais clínicos | | | | | | | | | | |
|-------------|-----------------|--------------------|----------|-----------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------|-----------------|-------------------|--------------------|
| | ID | Dia 6 pós infecção | | | | | Dia 7 pós infecção | | | | |
| | | Atividade | Postura | Abert. de olhos | Resp. a estímulos | Freq. respiratória | Atividade | Postura | Abert. de olhos | Resp. a estímulos | Freq. respiratória |
| Padrão SARS | 139 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 98 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 136 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | 144 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 146 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| KTD SARS | 91 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| | 94 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 morreu | 2 | 1 |
| | 124 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 125 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 morreu | 3 | 1 |
| | 87 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 morreu | 3 | 1 |
| | 95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 83 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| | 85 | 3 | 1 morreu | 1 | 2 | 1 | - | - | - | - | - |

Quadro 3. Contagem do escore de sinais clínicos apresentados pelos camundongos.

Estes resultados mostram que, de fato, o consumo da dieta cetogênica agravou a COVID-19 em modelo experimental. Para confirmar se o agravamento dos sinais clínicos também foi acompanhado de alterações morfológicas teciduais, realizamos uma análise histopatológica do parênquima pulmonar dos animais e verificamos que o tratamento com a dieta cetogênica, mesmo sem infecção foi suficiente para induzir a presença de um infiltrado celular mononuclear e polimorfonuclear (possivelmente neutrofilico) na microvasculatura pulmonar (**Figura 10**). Os animais infectados com SARS-CoV-2 exibiram um comprometimento importante do parênquima pulmonar com a presença de focos inflamatórios contendo células mononucleares e polimorfonucleares, além da congestão de vasos sanguíneos e a presença de focos de edema tecidual. Essas mesmas alterações foram encontradas e estavam ainda mais exacerbadas no grupo de animais infectados e tratados com a dieta cetogênica, que exibiu um comprometimento ainda maior do tecido pulmonar em conjunto com a presença de hemorragia tecidual e infiltrado celular na luz dos brônquios e bronquíolos. Portanto, em conjunto, estes resultados mostram que o consumo da dieta cetogênica de fato levou ao desenvolvimento de uma forma grave de COVID-19. É importante destacar que este efeito não estava associado com aumento de perda de peso dos animais que consumiram a dieta, mas sim com alterações inflamatórias na mucosa pulmonar que levaram a um aumento do recrutamento de neutrófilos para a vasculatura pulmonar

dependente da produção de IL-17 por linfócitos $T\gamma\delta$. Estes neutrófilos passam a infiltrar no parênquima pulmonar após a infecção pelo vírus, agravando a doença.

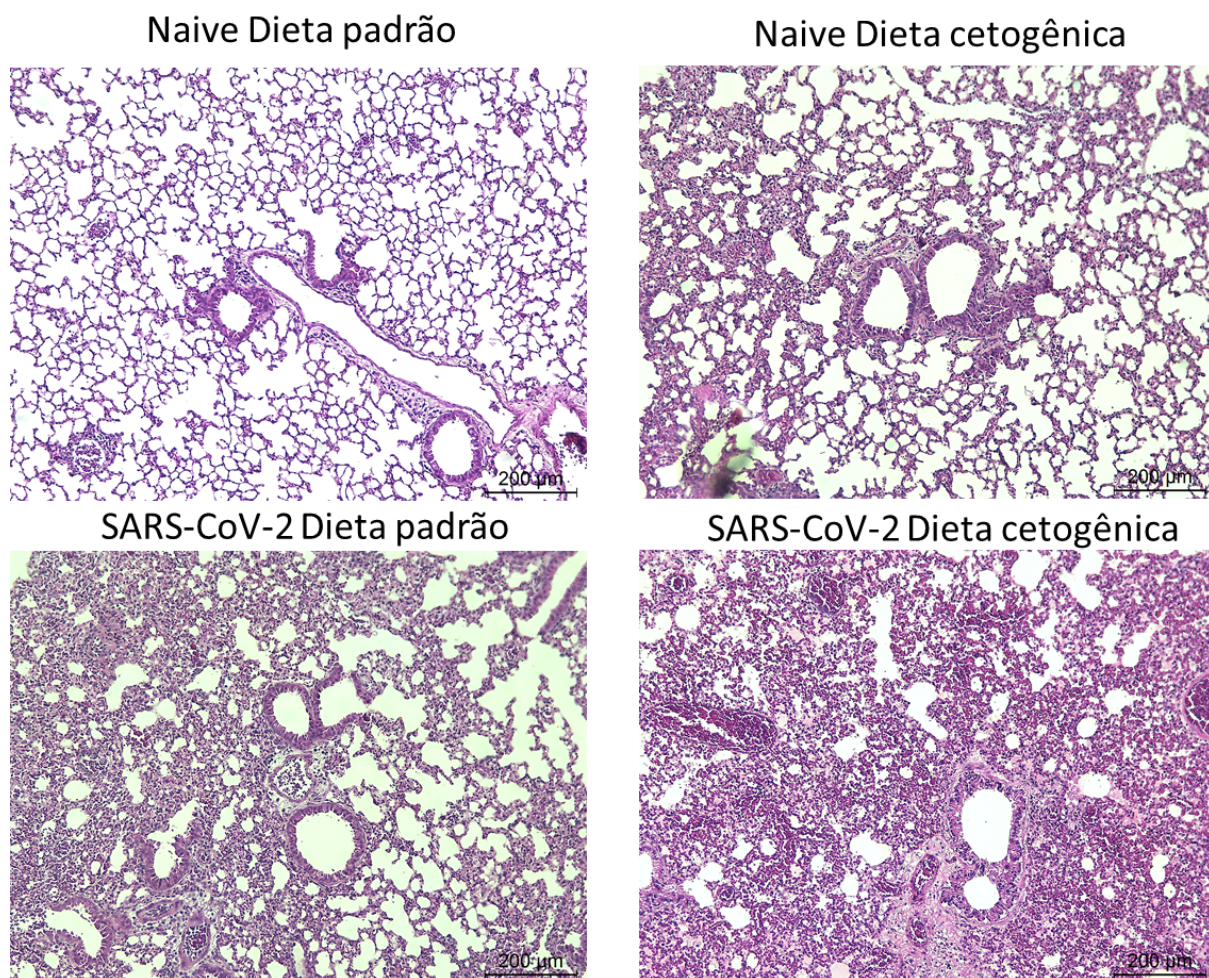


Figura 10. Análise histopatológica dos camundongos infectados com SARS-CoV-2. Camundongos transgênicos que expressam a proteína ACE2 foram alimentados com dieta padrão ou cetogênica durante 4 semanas. Após esse período, os animais foram infectados e foram infectados com 2×10^4 TCID₅₀ do vírus SARS-CoV-2 por via intranasal e no sétimo dia pós-infecção os pulmões dos animais foram coletados e processados para análise histopatológica. As imagens representam fotomicrografias representativas do tecido pulmonar dos diferentes grupos experimentais conforme indicado na figura.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o consumo de dieta cetogênica, com baixo teor de carboidratos, levou ao controle do ganho de peso, reduziu a glicemia e aumentou a produção de corpos cetônicos na circulação. Contudo, estas alterações foram acompanhadas de inflamação na mucosa pulmonar caracterizada pela presença de neutrófilos associados à vasculatura pulmonar que migram para o pulmão de maneira dependente da produção de IL-17. Por fim, o consumo da dieta cetogênica agravou a imunopatologia e os sintomas da COVID-19 em modelo experimental.

6 REFERÊNCIAS

- BARNES, B. J. et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. **The Journal of experimental medicine**, v. 217, n. 6, p. e20200652, 1 jun. 2020.
- BUDDEN KF, GELLATLY SL, WOOD DL, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(1):55-63. doi:10.1038/nrmicro.2016.142
- CODO, Ana Campos et al. Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /glycolysis-dependent axis. **Cell metabolism**, v. 32, n. 3, p. 437-446. e5, 2020.
- DASHTI, H. M., MATHEW, T. C., KHADADA, M., AL-MOUSAWI, M., TALIB, H., ASFAR, S. K., BEHBAHANI, A. I., & AL-ZAID, N. S. (2007). Beneficial effects of ketogenic diet in obese diabetic subjects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 302(1–2),249–256. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9448-z>.
- DOLHNIKOFF M., DUARTE-NETO A.N., DE ALMEIDA MONTEIRO R.A., DA SILVA L.F.F., DE OLIVEIRA E.P., SALDIVA P.H.N., MAUAD T., and NEGRI E.M.. 2020. Pathological evidence of pulmonary thrombotic phenomena in severe COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* 18:1517–1519. 10.1111/jth.14844
- FELSENSTEIN S, HERBERT JA, MCNAMARA PS, HEDRICH CM. COVID-19: Immunology and treatment options. **Clin Immunol.** 2020;215:108448. doi:10.1016/j.clim.2020.108448.
- FOX, S. E. et al. Pulmonary and Cardiac Pathology in Covid-19: The First Autopsy Series from New Orleans. **medRxiv**, p. 2020.04.06.20050575, 1 jan. 2020.
- FREEMAN, J. M.; KOSSOFF, E. H. Ketosis and the ketogenic diet, 2010: advances in treating epilepsy and other disorders. **Advances in pediatrics**, v. 57, n. 1, p. 315–29, jan. 2010.
- GOLDBERG, E. L. et al. Ketogenic diet activates protective $\gamma\delta$ T cell responses against influenza virus infection. **Science Immunology**, v. 4, n. 41, p. eaav2026, 15 nov. 2019.
- GOLDBERG, E. L., SHCHUKINA, I., ASHER, J. L., SIDOROV, S., ARTYOMOV, M. N., & DIXIT, V. D. (2020). Ketogenesis activates metabolically protective $\gamma\delta$ T cells in visceral adipose tissue. **In Nature Metabolism** (Vol. 2, Issue 1, pp. 50–61). <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0160-6>
- HOFFMAN M., KLEINE-WEBERH., SCHROEDER S., KRÜGER N., HERRLER T., ERICHSEN S., SCHIERGENS T.S., HERRLER G., WU N.-H., NITSCHKE A., et al. . 2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell.** 181:271–280.e8. 10.1016/j.cell.2020.02.052
- HUSSAIN, T. A. et al. Effect of low-calorie versus low-carbohydrate ketogenic diet in type 2 diabetes. **Nutrition**, v. 28, n. 10, p. 1016–1021, 2012.
- KANIKARLA-MARIE, P., & JAIN, S. K. (2015). Hyperketonemia (acetoacetate) upregulates NADPH oxidase 4 and elevates oxidative stress, ICAM-1, and monocyte adhesivity in endothelial cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 35(1), 364–373.<https://doi.org/10.1159/000369702>
- KASUGA, Y., ZHU, B., JANG, KJ. et al. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. **Exp Mol Med** 53, 723–736 (2021). <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00602-1>.
- KULCSAR, K. A. et al. Comorbid diabetes results in immune dysregulation and enhanced disease severity following MERS-CoV infection. **JCI Insight**, v. 4, n. 20, 17 out. 2019.
- LIM, H.W., LEE, J., HILLSAMER, P., & KIM, C. H. (2008). Human Th17 Cells Share Major Trafficking Receptors with Both Polarized Effector T Cells and FOXP3+ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, 180(1), 122–129. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.122>

LIU, J. et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Severe Illness Patients with 2019 Novel Coronavirus in the Early Stage. **medRxiv**, p. 2020.02.10.20021584, 1 jan. 2020.

LOVREN F, PAN Y, QUAN A, et al. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2008;295(4):H1377-H1384. doi:10.1152/ajpheart.00331.2008.

MA, D. et al. Ketogenic diet enhances neurovascular function with altered gut microbiome in young healthy mice OPEN. **SCieNtific RePoRTS** |, v. 8, p. 6670, 2018.

MAGRO C., MULVEI J.J., BERLIN D., NUOVO G., SALVATORE S., HARP J., BAXTER-STOLTZFUS A., and LAURENCE J.. 2020. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. **Transl. Res**. 220:1–13. 10.1016/j.trsl.2020.04.007

MANN, A., et al. (2012). Skin- and gut-homing molecules on human circulating gd T cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. **Clinical and Experimental Immunology**, 122–130

MARSLAND BJ, TROMPETTE A, GOLLWITZER ES. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. **Ann Am Thorac Soc**. 2015;12 Suppl 2:S150-S156. doi:10.1513/AnnalsATS.201503-133AW

NEWMAN, J. C., & VERDIN, E. (2014). Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(1), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.09.002>

NIKOLICH-ZUGICH, J. et al. SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. **GeroScience**, p. 1–10, 10 abr. 2020.

PENDYALA, S., WALKER, J. M., & HOLT, P. R.(2012). A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. **Gastroenterology**, 142(5), 1100–1101. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.034>.

QI F., QIAN S., ZHANG S., and ZHANG Z.. 2020. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 526:135–140. 10.1016/j.bbrc.2020.03.044

RAINS, J. L., & JAIN, S. K. (2011). Hyperketonemia increases monocyte adhesion to endothelial cells and is mediated by Irf-1 expression in monocytes and ICAM-1 expression in endothelial cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 301(2), 298–307. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00038.2011>

ROCA-HO, H. et al. Characterization of ACE and ACE2 Expression within Different Organs of the NOD Mouse. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 563, 5 mar. 2017.

SAMADDAR A., GROVER M. and NAG V. L., (2020) Pathophysiology and Potential Therapeutic Candidates for COVID-19: A Poorly Understood Arena. **Front. Pharmacol**. 11:585888. doi: 10.3389/fphar.2020.585888

SCHETT, G.; STICHERLING, M.; NEURATH, M. F. COVID-19: risk for cytokine targeting in chronic inflammatory diseases? **Nature Reviews Immunology**, 2020.

SHULLA A. et al.. 2011. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. **J. Virol**. 85:873–882. 10.1128/JVI.02062-10.

SWIDSINSKI A, DÖRFFEL Y, LOENING-BAUCKE V, et al. Reduced Mass and Diversity of the Colonic Microbiome in Patients with Multiple Sclerosis and Their Improvement with Ketogenic Diet. **Front Microbiol**. 2017;8:1141. Published 2017 Jun 28. doi:10.3389/fmicb.2017.01141

TAY, M.Z., POH, C.M., RÉNIA, L. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol** 20, 363–374 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>

WANG, J.-W. et al. Prevalence and clinical characteristics of hypertension and metabolic syndrome in newly diagnosed patients with ketosis-onset diabetes: a cross-sectional study. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 11, p. 31, 25 abr. 2019.

WHO. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2022.

ZHU, J. et al. Clinical characteristics of 3,062 COVID-19 patients: a meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. n/a, n. n/a, 15 abr. 2020.

ZHENG, M. et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular & Molecular Immunology**, 2020

ANEXO A - Ficha Técnica Dieta Cetogênica High Fat

RHOSTER**Dieta Cetogênica High Fat****RH195150**

| Perfil Calórico | % | % kcal |
|-----------------|------|--------|
| Proteína | 15,3 | 9,2 |
| Carboidrato | 0,5 | 0,3 |
| Gordura | 67,4 | 90,5 |
| Dieta 6,7kcal/g | *** | *** |

*Dieta Purificada para indução de Cetose (não tem carboidrato para processar)

*Produzida em Pasta - Pacotes de 500g

*Quantidade mínima 3kg

*Prazo de Entrega: até 15 dias úteis

Ingredientes

Caseína Láctea, DL-Metionina, Celulose, Óleo de Milho, Sacarose, L-Cistina, Gordura Vegetal, Mix Mineral RH9524*, Mix Vitamínico RH9525**, Fosfato de Cálcio bibásico, Carbonato de Cálcio, Óxido de Magnésio, Bitartarato de Colina, TBHQ.

Mais Informações

*Mix Mineral deficiente em Cálcio e Fósforo

**Mix Vitamínico específico para Dietas Cetogênicas

***Resultados calculados a partir da análise de um determinado lote fabricado.

RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

Av.Ministro Antonino Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd.Salete - Araçoiaba da Serra/SP - CEP: 18190-000

Fones: (15) 3281-3037 / (15) 3281-4748 - CNPJ 00.984.204/0001-04 - Inscr.Estadual 178.070.220.114

Acesse o site para cadastramento: www.rhoster.com.br

Anexo B - Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Eixo intestino-pulmão: Contribuição do dano tecidual causado pela cetose e cetoacidose na patogênese da COVID-19 e desenvolvimento de estratégias de intervenção para reduzir a morbidade da doença", protocolada sob o CEUA nº 3147240820, sob a responsabilidade de **Denise Moraes da Fonseca e equipe; Marina Caçador Ayupe; Caio Loureiro Salgado; Erika Machado de Salles; Paula Carolina de Souza; Ana Márcia de Sá Guimarães; Antonio Francisco de Souza Filho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 17/12/2020.

We certify that the proposal "Gut-lung axis: Contribution of tissue damage caused by ketosis for the pathogenesis of COVID-19 and development of therapeutic strategies against the disease ", utilizing 72 Hamsters (72 females), 735 Isogenics mice (735 females), 240 Genetically modified mice (GMO) (240 females), protocol number CEUA 3147240820, under the responsibility of **Denise Moraes da Fonseca and team; Marina Caçador Ayupe; Caio Loureiro Salgado; Erika Machado de Salles; Paula Carolina de Souza; Ana Márcia de Sá Guimarães; Antonio Francisco de Souza Filho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 12/17/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

| | | | |
|-----------|--|--------------|-------------------------------|
| Origem: | Biotério do VPS - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal | | |
| Espécie: | Hamsters | sexo: Fêmeas | Idade ou peso: 9 a 11 semanas |
| Linhagem: | Sírios | | N amostral: 72 |
| Origem: | Biotério Central FMUSP | | |
| Espécie: | Camundongos isogênicos | sexo: Fêmeas | Idade ou peso: 20 a 25 g |
| Linhagem: | C57BL/6 | | N amostral: 735 |
| Origem: | Biotério do Departamento de Imunologia | | |
| Espécie: | Camundongo geneticamente modificado (OGM) | sexo: Fêmeas | Idade ou peso: 20 a 25 g |
| Linhagem: | K18-hACE2 | | N amostral: 240 |

São Paulo, 12 de janeiro de 2022

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

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

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva

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

São Paulo, 26 de novembro de 2021
CEUA N 3147240820

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Denise Moraes Da Fonseca
Área: Imunologia

Título da proposta: "Eixo intestino-pulmão: Contribuição do dano tecidual causado pela cetose e cetoadicose na patogênese da COVID-19 e desenvolvimento de estratégias de intervenção para reduzir a morbidade da doença".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 001887)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 24/novembro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitamos a inclusão do seguinte membro na proposta: Gabriele Manamy Baba Rodrigues. Trata-se de uma aluna de Iniciação Científica que irá ajudar na execução dos experimentos e parte dos resultados obtidos serão utilizados no seu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Em anexo encontra-se o certificado de treinamento da aluna. Em paralelo solicitamos alteração no local da realização dos experimentos de infecção dos animais. Em vez de utilizar o laboratório NB3 localizado no ICB, utilizaremos as instalações de biossegurança NB3 junto ao Laboratório de Biologia Molecular III-A do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Não estamos solicitando animais adicionais Descrição do procedimento experimental: Os procedimentos referentes a esta etapa do projeto serão executados em 2 biotérios em diferentes unidades da USP - Cidade Universitária. Como o objetivo final do projeto é avaliar o efeito do tratamento com dietas cetogênicas sobre a infecção por SARS-CoV-2, será necessário o uso das instalações de biossegurança NB3 junto ao Laboratório de Biologia Molecular III-A do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP. Entretanto, a primeira etapa do tratamento com as dietas se iniciará antes da infecção e deverá, portanto, ser realizada no biotério NB2 do Departamento de Imunologia do ICB/USP (CEUA ICB/USP 3147240820). Os animais serão tratados com dieta cetogênica no biotério do ICB/USP durante 3 semanas, na primeira semana será realizada a aclimação dos animais à dieta. Para isso, os animais receberão a dieta regular misturada a quantidades crescentes de dieta cetogênica ao longo dos dias, até que no início da segunda semana passe a receber apenas a dieta cetogênica. Trabalhamos no laboratório com esta dieta há 6 anos utilizando este sistema de aclimação para que os animais não tenham problemas de adaptação à nova dieta. Ao final da terceira semana, os animais serão transferidos para a sala de manutenção da animais do NB3 junto ao Laboratório de Biologia Molecular III-A do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, e permanecerão sob a dieta cetogênica até o final do experimento. Após uma semana de aclimação no NB3, os animais serão infectados e eutanasiados após uma semana. Dessa forma, os procedimentos experimentais compreendem (1) tratamento com dietas cetogênicas; (2) infecção e (3) eutanásia. Os grupos experimentais compreenderão: (a) dieta controle e sem infecção; (b) dieta KTD1 (à base de gordura vegetal) e sem infecção; (c) dieta KTD2 (à base de gordura animal) e sem infecção; (d) dieta controle + infecção de 6 dias por SARS-CoV-2; (e) dieta KTD1 + infecção de 6 dias por SARS-CoV-2; (f) dieta KTD2 + infecção de 6 dias por SARS-CoV-2; Cada grupo experimental será composto por 5 animais, totalizando 30 animais por experimento. Os experimentos serão repetidos 3 vezes, totalizando 90 animais no delineamento 1. Este número de animais por grupo foi estabelecido com base em resultados preliminares do laboratório de Imunologia de Mucosas utilizando animais tratados com as diferentes dietas (CEUA ICB/USP 3147240820 e 9410211019) e que mostram que o uso da dieta KTD1 levou a um intenso recrutamento neutrofílico no pulmão dos animais, após 2 e 4 semanas de tratamento. Não estamos solicitando animais adicionais pois estes animais estão previstos no projeto original enviado à CEUA/ICB. Segue em anexo o certificado de aprovação da CEUA/FCF. "

Comentário da CEUA: "A CEUA aprova a alteração no local de realização de experimentos e a inclusão de Gabriele Manamy Baba Rodrigues no projeto CEUA Nº 3147240820."



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



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