

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de pós-graduação em Microbiologia**

Samantha Neves de Oliveira

**MODULAÇÃO DA RESPIRAÇÃO ANAERÓBIA EM TÁXONS DISBIÓTICOS POR  
IgG DURANTE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS: estudos *in silico* e em  
modelo experimental**

Belo Horizonte

2023

Samantha Neves de Oliveira

**MODULAÇÃO DA RESPIRAÇÃO ANAERÓBIA EM TÁXONS DISBIÓTICOS POR  
IgG DURANTE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS: estudos *in silico* e em  
modelo experimental**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

Co-orientador: Dr. Diego Lisboa Rios.

Belo Horizonte

2023

043

Oliveira, Samantha Neves de.

Modulação da respiração anaeróbia em táxons disbióticos por IgG durante doenças inflamatórias intestinais: estudos in silico e em modelo experimental [manuscrito] / Samantha Neves de Oliveira. – 2023.

99 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes. Co-orientador: Dr. Diego Lisboa Rios.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Colite. 3. Escherichia coli. 4. Anticorpos Anticitoplasma de Neutrófilos. 5. Nitratos. I. Fagundes, Caio Tavares. II. Rios, Diego Lisboa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **SAMANTHA NEVES DE OLIVEIRA**

Nº REGISTRO: **2021661452**

Às 14:00 horas do dia **20 de abril de 2023**, reuniu-se por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Angélica Thomaz Ribeiro (Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG), Daiane Boff (NYU Grossman School of Medicine) e o Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes (Orientador), para julgar o trabalho final **“Modulação da respiração anaeróbia em táxons disbióticos por IgG durante doenças inflamatórias intestinais: estudos *in silico* e em modelo experimental”**, da aluna **Samantha Neves de Oliveira**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 20 de abril de 2023

Membros da banca:

Profa. Dra. Angélica Thomaz Ribeiro

Dra. Daiane Boff

De acordo:

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

(Orientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação)



Documento assinado eletronicamente por **Daiane Boff, Usuária Externa**, em 25/04/2023, às 09:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica Thomaz Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 25/04/2023, às 12:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 25/04/2023, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 25/04/2023, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2179051** e o código CRC **B53625E6**.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes que me recebeu no laboratório e pela valiosa orientação, apoio e dedicação com que me auxiliou durante esta etapa da minha formação. Ao Dr. Diego Lisboa Rios pela orientação e auxílio, especialmente na parte de bioinformática do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG sou grata pela dedicação e excelência no ensino. A CAPES, INCT e demais órgãos de fomento obrigada pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Agradeço a equipe do Laboratório de interação Microrganismo-hospedeiro (LIMHO) pelo acolhimento, em especial a Raquel, Camila por toda a ajuda com algumas metodologias a serem realizadas. Agradeço também as professoras Danielle e Mila, e a técnica Frank por todo o suporte, conhecimento e experiências trocadas. Estes dois anos contribuíram imensamente para a minha formação.

Gratidão pela minha família, em especial aos meus pais, Cassiana e Alex, por sempre acreditarem no meu potencial e me motivarem a cada etapa do caminho até aqui. Esta é uma conquista nossa, obrigada pelo amor, compreensão, fé e inspiração.

A minha família Lobatucada e LIMHO, Bruno, Madu, Matheus Alves, Giuliana, Victor, Thales e Rafael agradeço pela amizade e por compartilharmos momentos de alegria e dificuldade. Aos outros membros desta família, Bárbara, Renan, Anna e Letícia, Cinthia gostaria de fazer um agradecimento especial. Obrigada por me auxiliarem nas etapas deste trabalho e sempre oferecer um apoio incondicional, tanto pessoal quanto acadêmico, vocês são muito especiais para mim e tornaram os dias muito mais leves.

Também agradeço a todos os meus amigos que acompanharam toda a minha trajetória até aqui. Em especial, Mateus Prates que é uma pessoa que sempre me motivou e apoiou incondicionalmente meus sonhos. Ao Igor que além de vizinho se tornou um dos meus alicerces em BH, obrigada pela amizade e companhia. Obrigada também a Karen, Vania, Núbia, Patrícia, Camila e Iasmim, pelo carinho, apoio, companheirismo e palavras de conforto e motivação sempre.

## Resumo

Doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa, geram alterações significativas no lúmen intestinal. Dentre elas há o aumento nas concentrações de óxido nítrico (NO) e aumento da abundância de Proteobacteria, especialmente da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*. Estas são capazes de utilizar nitrato, S-óxidos e N-óxidos como aceptores terminais de elétrons na respiração anaeróbica. Assim, o excesso de NO produzido durante a colite pode favorecer a expansão desta família. Recentemente foi observado em estudos do nosso grupo que a IgG pode regular a produção de NO durante a colite ulcerativa, via ativação de receptores FcγR. Diante disso, o objetivo deste trabalho é compreender o papel da IgG no controle da produção de óxido nítrico e seu impacto para o processo disbiótico gerado pela colite ulcerativa. Visamos testar a hipótese de que IgG controla a expansão de Enterobacteriaceae durante respostas inflamatórias intestinais por regular a produção de NO por meio de análises multi-ômicas de um banco de dados de pacientes portadores de DII, experimentos *in vitro* com isolados disbióticos e experimentos *in vivo* em modelo murino de colite ulcerativa, induzida por DSS (Sulfato de sódio dextrana). Neste último sistema, utilizamos animais deficientes para o receptor FcγRIIB, que apresentam alterações no seu repertório de IgG reativa à microbiota, e ensaios de competição entre linhagens de *Escherichia coli* selvagens ou mutantes incapazes de utilizar nitrato na respiração anaeróbia. O perfil sorológico permitiu agrupar pacientes com diferentes diagnósticos de DII. Um desses grupos, caracterizado por elevados títulos de ANCA, apresentou diferenças em sua microbiota intestinal, com maior conteúdo relativo de *Citrobacter*, *Escherichia coli* e *Proteus*, entre outras alterações. Além disso, esses pacientes apresentaram alterações transcricionais, caracterizadas por enriquecimento de vias envolvidas na resposta imune e inflamatória, indicando que a resposta sorológica está relacionada a alterações transcricionais e de microbiota. Animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentaram uma colite acentuada após exposição ao DSS, associado à maior produção da quimiocina CXCL1 e translocação bacteriana para o fígado. Ainda, nossos dados sugerem que FcγRIIB é importante para "instruir" a ativação dos macrófagos, reprimindo a produção de NO e induzindo aumento de CD11b. Na ausência do receptor, o padrão de ativação é invertido. Também observamos que o uso de nitrato comoceptor final de elétrons confere alguma vantagem competitiva para bactérias isoladas das fezes e fígado dos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, identificadas presuntivamente como *E. coli*. Os ensaios de competição utilizando bactérias selvagens e linhagens  $\Delta narGnapAnarZ$  sugerem que o uso

de nitrato como aceptor final de elétrons confere uma vantagem para bactérias durante a colite nos animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>*. Consistente com isso, a inibição de iNOS impede a vantagem competitiva da linhagem selvagem sobre a mutante e resulta em menor translocação da linhagem selvagem para o fígado dos animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>*. Além disso, vimos que a utilização do nitrato no crescimento anaeróbio gera uma menor produção de indol indicando uma mudança fenotípica relacionada à virulência da bactéria. Em conclusão, esses dados demonstram que IgG interfere na composição da microbiota durante DII em parte por modular a produção de NO pelo hospedeiro e conseqüente expansão e eventual translocação de linhagens bacterianas que utilizam o nitrato na respiração anaeróbia.

Palavras-chave: Colite; multiômicas; ANCA; nitrato; *Escherichia coli*.

## Abstract

Inflammatory bowel diseases, such as ulcerative colitis, generate changes in the intestinal lumen. Among them there is an increase in nitric oxide (NO) concentrations and an increase in the abundance of Proteobacteria, especially from the Enterobacteriaceae family, such as *Escherichia coli*. These are capable of using nitrate, S-oxides and N-oxides as terminal electron acceptors in anaerobic respiration. Thus, the excess of NO produced during colitis may favor the expansion of this family. It was recently observed in studies by our group that IgG can regulate NO production during ulcerative colitis, via activation of FcγR receptors. Therefore, the objective of this work is to understand the role of IgG in controlling the production of nitric oxide and its impact on the dysbiotic process generated by ulcerative colitis. We aimed to test the hypothesis that IgG controls the expansion of Enterobacteriaceae during intestinal inflammatory responses by regulating NO production through multi-omic analysis of a database of patients with IBD, in vitro experiments with dysbiotic isolates and in vivo experiments in a murine model of ulcerative colitis, induced by DSS (Sodium dextran sulfate). In this last system, we used animals deficient for the FcγRIIB receptor, which present alterations in their microbiota-reactive IgG repertoire, and competition assays between wild-type *Escherichia coli* strains or mutants incapable of using nitrate in anaerobic respiration. The serological profile allowed grouping patients with different IBD diagnosis. One of these groups, characterized by high titers of ANCA, showed differences in its intestinal microbiota, with a higher relative content of *Citrobacter*, *Escherichia coli* and *Proteus*, among other alterations. In addition, these patients had transcriptional alterations, characterized by enrichment of pathways involved in the immune and inflammatory response, indicating that the serological response is related to transcriptional and microbiota alterations. *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> animals showed a marked colitis after exposure to DSS, associated with increased production of the chemokine CXCL1 and bacterial translocation to the liver. Furthermore, our data suggest that FcγRIIB is important to "instruct" the activation of macrophages, repressing NO production and inducing an increase in CD11b. In the absence of the receptor, the activation pattern is reversed. We also observed that the use of nitrate as a final electron acceptor confers some competitive advantage to bacteria isolated from feces and liver of *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> animals, presumptively identified as *E. coli*. Competition assays using wild-type bacteria and *AnarGnapAnarZ* strains suggest that the use of nitrate as the final electron acceptor confers an advantage to bacteria during colitis in *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> animals. Consistent with

this, inhibition of iNOS prevents the competitive advantage of the wild-type strain over the mutant and results in less translocation of the wild-type strain into the liver of *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> animals. In addition, we saw that the use of nitrate in anaerobic growth generates a lower production of indole, indicating a phenotypic change related to the virulence of the bacterium. In conclusion, these data demonstrate that IgG interferes with the composition of the microbiota during IBD in part by modulating the production of NO by the host and consequent expansion and eventual translocation of bacterial strains that use nitrate in anaerobic respiration.

Keywords: ulcerative colitis; multi-omics; ANCA; nitrate; *Escherichia coli*.

## Lista de abreviações, siglas e símbolos

AG: Aminoguanidina

AMPs: Peptídeos antimicrobianos

ANCA: anticorpo citoplasmático anti-neutrófilo

Anti-CBir1: anticorpo anti-flagelina

Anti-OmpC: anti-porina de membrana externa C

ASCA: Anti-Saccharomyces cerevisiae

CDs: Células dendríticas

CFU: *colony forming unit* - Unidade formadora de colônias

DC: Doença de Crohn

DII: Doença inflamatória intestinal

DSS: sulfato de sódio dextrana

Fab: Fragmento de ligação ao antígeno

FACS: citometria de fluxo

Fc: “fragmento cristalino”

FcRn: FcRs neonatais

FcγR: Receptores para a região constante das imunoglobulinas IgG

GALT: Tecido linfóide associado ao intestino

HMP2: *Integrative Human Microbiome Project*

IBDMDB: Banco de Dados Multi-ômicos de Doenças Intestinais Inflamatórias

IFN $\gamma$ : Interferon-gama

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IL-( ) - Interleucina - ( )

iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzível

ITAM: Motivo de ativação de tirosina-imunorreceptor

ITIM: Motivo inibidor de tirosina-imunorreceptor

L-Arg: L-arginina

NLRs: Receptores semelhantes a NOD

NO: Óxido nítrico

OONO $\cdot$ : peroxinitrito

NO $_3^-$ : Nitrato

N-óxidos: óxidos de aminas terciárias e

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS - *phosphate-buffered saline* – salina tamponada por fosfato

PPs: Placas de Peyer

PRR: Receptor de Reconhecimento de Padrão

RNS: espécies reativas de nitrogênio

ROS: espécies reativas de oxigênio

S-óxidos: óxidos de sulfetos orgânicos

TGF- $\beta$ : Fator de transformação do crescimento beta

TLRs: Receptores semelhantes a Toll

TNF: Fator de necrose tumoral

Treg: Células T reguladoras

UC: Colite ulcerativa

## Lista de figuras

Figura 1. Receptores Fcγ canônicos e não canônicos de humanos e murinos.....	24
Figura 2. Interrupção da anaerobiose no epitélio e lúmen do cólon durante a disbiose intestinal.....	27
Figura 3. Doença inflamatória intestinal e microbiota.....	28
Figura 4. Modelo proposto para a geração de aceptores de elétrons respiratórios durante a inflamação intestinal.....	30
Figura 5. Delineamento experimental.....	40
Figura 6. Caracterização do perfil sorológico de cada grupo de pacientes de acordo com diagnóstico.....	49
Figura 7. Novo agrupamento de pacientes a partir da determinação do fenótipo sorológico.....	50
Figura 8. Diversidade alfa da microbiota entre os agrupamentos de acordo com fenótipo sorológico.....	53-54
Figura 9. Composição da microbiota dos pacientes agrupados de acordo com fenótipo sorológico.....	56-59
Figura 10. Genes diferencialmente expressos entre pacientes do grupo anti-CBir1 e pacientes do grupo ANCA.....	60
Figura 11. Vias transcricionais ativadas em pacientes do grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1.....	62-63
Figura 12. Vias transcricionais suprimidas em pacientes do grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1.....	64
Figura 13. Comunicação entre vias transcricionais enriquecidas em pacientes do grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1.....	66

Figura 14. Quantificação de Imunoglobulina G anti-bactérias fecais e anti-isolados disbióticos no soro de animais <i>Mu</i> <sup>-/-</sup> , WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> .....	69
Figura 15. Opsonização de isolados disbióticos por soros de animais <i>Mu</i> <sup>-/-</sup> , WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> .....	70
Figura 16. Caracterização da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> .....	72
Figura 17. Quantificação de citocinas e quimiocinas do cólon de animais WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> com colite induzida por DSS.....	73
Figura 18. Populações de células imunes presentes no cólon de camundongos WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> e seu perfil de expressão de CD11b após indução de colite.....	74
Figura 19. Expressão de iNOS em populações de células imunes presentes no cólon de camundongos WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> .....	75
Figura 20. Expressão de iNOS em populações de macrófagos presentes no cólon de camundongos WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> .....	76
Figura 21. Curvas de crescimento de diferentes linhagens de <i>E. coli</i> cultivadas em meios contendo diferentes aceptores de elétrons respiratórios.....	77
Figura 22. Caracterização da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> submetidos ao ensaio e competição de linhagens de <i>E. coli</i> e expostos ou não à aminoguanidina.....	79
Figura 23. Expansão de enterobactérias durante colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos WT e <i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> submetidos ao ensaio e competição de linhagens de <i>E. coli</i> e expostos ou não à aminoguanidina.....	81

## Lista de tabelas

Tabela 1. Divisão da coorte por diagnóstico, sexo, características físicas e local.....	48
Tabela 2. Novo agrupamento da coorte de acordo com perfil sorológico.....	51
Tabela 3. Caracterização fenotípica dos isolados de enterobactérias por testes bioquímicos.....	68

## Sumário

<b>Resumo</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>Lista de abreviações, siglas e símbolos</b>	<b>10</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>13</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>15</b>
<b>Sumário</b>	<b>16</b>
<b>1 Revisão bibliográfica</b>	<b>18</b>
1.1 Microbiota intestinal e sua influência no intestino e sistema imunológico	18
1.2 Imunoglobulina G e a microbiota indígena	20
1.3 Disbiose intestinal – desenvolvimento da colite ulcerativa e efeito do óxido nítrico	26
<b>2 Justificativa</b>	<b>32</b>
<b>3 Objetivos</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
<b>4 Metodologia</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Abordagens bioinformáticas</b>	<b>34</b>
Análise de dados multi-ômicos	34
<b>4.2 Estudos in vitro com isolados disbióticos</b>	<b>35</b>
Descrição de isolados disbióticos de Enterobacteriaceae e linhagens padrão de Escherichia coli	35
Condições de crescimento dos isolados	35
Opsonização de isolados disbióticos e marcação das células bacterianas para ensaio de deposição de IgG do soro	36
Quantificação de nitrito pelo método de Griess	37
Quantificação de Indol	37
<b>3.3 Estudos in vivo</b>	<b>38</b>
Animais	38
Indução da colite	38
Tratamento com aminoguanidina	38
Exposição dos animais a linhagens de E. coli e ensaio de competição	38
Desenho experimental	39
Obtenção de sobrenadante das fezes	41
Sangue oculto nas fezes	41
Determinação do escore clínico	41
Eutanásia e obtenção de soro	42
Coleta e medição do cólon	42
Obtenção de extratos de bactérias fecais e de isolados bacterianos disbióticos	42
Quantificação de proteínas nos extratos bacterianos	43
Obtenção de extratos de proteínas do cólon	43

ELISAs	44
Quantificação de IgG anti-microbiota fecal e anti-isolados disbióticos	44
Quantificação de citocinas e quimiocinas	44
Isolamento de leucócitos da lâmina própria intestinal	45
Marcação de leucócitos e citometria de fluxo para avaliar a expressão de iNOS	46
<b>3.4 Análise estatística</b>	<b>47</b>
<b>4 Resultados</b>	<b>47</b>
4.1 Caracterização da coorte selecionada do banco de dados e determinação de perfis sorológicos	47
4.2 Comparação entre o fenótipo sorológico e a composição da microbiota dos hospedeiros	52
4.3 Comparação entre o fenótipo sorológico e a expressão gênica	59
4.4 Caracterização do repertório de IgG anti-microbiota em animais WT e Fcgr2b <sup>-/-</sup> :	67
4.5 Caracterização da doença e da produção de citocinas e quimiocinas durante a colite em animais selvagens (WT) deficientes para o receptor de IgG FcγRIIB (Fcgr2b <sup>-/-</sup> )	71
4.6 Expressão de iNOS por leucócitos no cólon após indução da colite em animais WT e Fcgr2b <sup>-/-</sup>	73
4.7 Isolados disbióticos de animais submetidos à colite são capazes de usar nitrato como aceptores finais de elétrons in vitro.	76
4.8 Nitrato como acceptor final de elétrons favorece translocação da população bacteriana para o fígado durante a colite ulcerativa em Fcgr2b <sup>-/-</sup>	78
<b>5 Discussão</b>	<b>82</b>
<b>6 Conclusão</b>	<b>90</b>
<b>7 Referências</b>	<b>91</b>

## 1 Revisão bibliográfica

### 1.1 Microbiota intestinal e sua influência no intestino e sistema imunológico

O intestino humano possui uma população diversa de microrganismos em uma dinâmica complexa que exerce influência marcante no hospedeiro, tanto na homeostase quanto na doença (Thursby e Juge, 2017). O início do processo de colonização microbiana ocorre no nascimento (Sonnenburg e Sonnenburg, 2019) e a estabilização das características dessa microbiota acontece após dois anos de vida, período em que se inicia o clímax da colonização intestinal (Rutten et al. 2015). A microbiota pode sofrer modificações e adaptações ao longo da vida, devido a fatores como condições ambientais variáveis, por exemplo, determinadas dietas e uso de antimicrobianos (Dieterich et al., 2018; Sonnenburg e Sonnenburg, 2019). Contudo, graças à característica denominada resiliência, esta pode se restabelecer e voltar a sua composição anterior a perturbação (Shin et al., 2015). Dentre os microrganismos que compõem a microbiota intestinal podemos citar as bactérias, arqueas, bacteriófagos e outros vírus, eucariotos unicelulares e fungos, sendo as bactérias os microrganismos mais estudados. Estes co-evoluíram com o hospedeiro ao longo de milhares de anos formando uma relação intrincada e mutuamente benéfica (Bäckhed, 2005; Gregory et al., 2018). É importante ressaltar que o padrão individual da microbiota é altamente variável (Dieterich et al., 2018).

O número de microrganismos que colonizam o intestino foi estimado em  $10^{14}$  (Zhang e Frenette, 2019). A maioria dos microrganismos presentes no intestino humano são bactérias estritamente anaeróbias (Mahowald et al., 2009) e pertencem predominantemente aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, seguidos por Proteobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia (Zhang et al., 2020; Bäumler e Sperandio, 2016). O cólon é a parte que apresenta a maior diversidade e maior número de células microbianas (Tungland, 2018), tornando-o um dos ecossistemas mais densamente colonizados do corpo. Ele abriga principalmente bactérias das famílias Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae e Ruminococcaceae (Hall et al., 2017).

A comunidade microbiana desempenha um papel indispensável na resistência a patógenos, formando uma barreira que impede a colonização de bactérias de espécies ou linhagens diferentes, além de induzir a secreção de AMPs (Peptídeos Antimicrobianos), produzidos principalmente pelas células de Paneth, células secretoras especializadas da

mucosa (Moens e Veldhoen, 2012; Bevins e Salzman, 2011). A microbiota regula significativamente o desenvolvimento e a função do sistema imunológico inato e adaptativo, modulando a atividade imune (Negi et al., 2019<sup>a</sup>). Uma microbiota equilibrada no intestino é de grande importância na função imunológica e, conseqüentemente, na manutenção da homeostase (McAleer e Kolls, 2018).

Além desta funcionalidade, a microbiota também influencia no desenvolvimento e na fisiologia do hospedeiro. A fisiologia pode alterar-se a nível celular pela ação do microbioma por sinalização celular, proliferação e biossíntese de neurotransmissores (Ijssennagger et al., 2015; Yano et al., 2015), gerando alterações na mucosa e até mesmo uma modificação sistêmica, afetando assim a homeostase, função de barreira, metabolismo e respostas imunes (Yano et al., 2015; Reinhardt et al., 2012; Cho et al., 2012). Entre outros aspectos fisiológicos que a microbiota modula podemos citar a morfogênese do órgão, vascularização intestinal, carcinogênese, massa óssea e também o comportamento do hospedeiro (Sommer e Bäckhed, 2013). Segundo Sommer e Bäckhed, essa microbiota também facilita o metabolismo e promove a adiposidade do hospedeiro, expandindo as fontes de nutrientes, produzindo vitaminas essenciais e realizando o metabolismo de xenobióticos.

O maior tecido imunológico do corpo é o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e existe um equilíbrio recíproco entre este tecido e a microbiota indígena (Chistiakov et al., 2015). A microbiota emite sinais que levam as células imunológicas a gerar respostas pró e anti-inflamatórias (Negi et al., 2019<sup>b</sup>). As bactérias intestinais são a principal fonte de antígenos naturais que estimulam o GALT e induzem a tolerância imunológica (Chistiakov et al., 2015). Dentre as bactérias intestinais, observou-se que *Bacteroides fragilis* e várias linhagens comensais de *Clostridium* induzem a diferenciação de células Treg (células T reguladoras) no cólon e sua maturação funcional, gerando uma resposta tolerogênica (Luu et al., 2017).

O epitélio intestinal e as Células Dendríticas (CDs) reconhecem as bactérias patogênicas e comensais por meio dos chamados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) na sua superfície, como os receptores semelhantes a Toll (TLRs). Eles são responsáveis por defender o hospedeiro contra patógenos, por regular a abundância de micróbios comensais e por manter a integridade do tecido. Outros PRRs relacionados a

modulação da composição da microbiota intestinal são os receptores semelhantes a NOD (NLRs). Eles realizam a identificação, através do reconhecimento de elementos microbianos, ou PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) (Zheng et al., 2020). Os PRRs possuem um papel central na ativação do sistema imunológico, sendo que a ligação de derivados microbianos aos PRRs leva ao recrutamento de células imunes do sistema imunológico inato e adaptativo, como células T, células plasmáticas e macrófagos, para o local da infecção, além de promover a secreção de quimiocinas e citocinas (Dieterich et al., 2018). Cada bactéria gera um padrão individual de citocinas, podendo ser pró ou anti-inflamatórias, como IL-23, IL-12p70 e IL-10. Esta particularidade mostra o ajuste fino entre o sistema imunológico do hospedeiro e a microbiota e, dependendo do microbioma, vemos uma resposta de inflamação ou tolerância (Manuzak et al., 2012; Dieterich et al., 2018).

Grande parte dos anticorpos imunoglobulina A (IgA) produzidos pelas células plasmáticas localizadas nas Placas de Peyer (PPs) ocorre após ativação de TLR das células T e B por antígenos microbianos. Esta imunoglobulina reveste uma fração substancial da microbiota, limitando a translocação para tecidos extra-intestinais (Bunker et al., 2018). Zeng e colaboradores (2016), utilizando modelo murino, observaram que as Imunoglobulinas G também são capazes de limitar a translocação microbiana. Comumente alguns tipos de IgG se ligam a proteobactérias intestinais podendo limitar sua translocação para os demais tecidos do hospedeiro, tanto na homeostase quanto na inflamação.

## **1.2 Imunoglobulina G e a microbiota indígena**

A simbiose entre hospedeiro e microbiota é crucial para o hospedeiro instruir o sistema imunológico, construir tolerância imunológica adequada, prevenir a invasão de patógenos e receber metabólitos essenciais (Pickard et al., 2017). A manutenção da homeostase do trato gastrointestinal é essencial para combater a disfunção intestinal, assim como distúrbios sistêmicos (Lach et al., 2018; Zheng et al., 2020). Durante a homeostase, macrófagos, células dendríticas e células T CD4<sup>+</sup> são hiporresponsivas à estimulação das bactérias comensais, impedindo assim uma resposta inflamatória (Clement et al., 2012). Contudo, em processos infecciosos observa-se uma resposta imune tanto contra os microrganismos patogênicos quanto os comensais (Hand et al., 2012).

Uma característica da resposta imune adaptativa intestinal é a produção de grandes quantidades de imunoglobulinas (Ig) IgA e IgG, isotipos de anticorpos predominantemente encontrados na superfície da mucosa intestinal (Cerutti e Rescigno, 2008; Armstrong et al., 2019). Essas imunoglobulinas conferem proteção durante infecções, ligando-se a patógenos e revestindo-os no lúmen intestinal (Armstrong et al., 2019). Cisalpino e colaboradores (2017), demonstraram em experimentos utilizando camundongos *germ-free*, que animais isentos de microbiota apresentavam menor concentração de IgG circulantes e essa menor concentração era reversível a partir da convencionalização desses animais, onde se administrou fezes de animais convencionais por gavagem oral. Este trabalho ilustra bem o papel da microbiota na produção da IgG sistêmica. A imunoglobulina G induzida pela microbiota intestinal além de atuar localmente também é capaz de controlar infecções sistêmicas por bactérias simbióticas e patógenos (Zeng et al., 2016; Cisalpino et al., 2017).

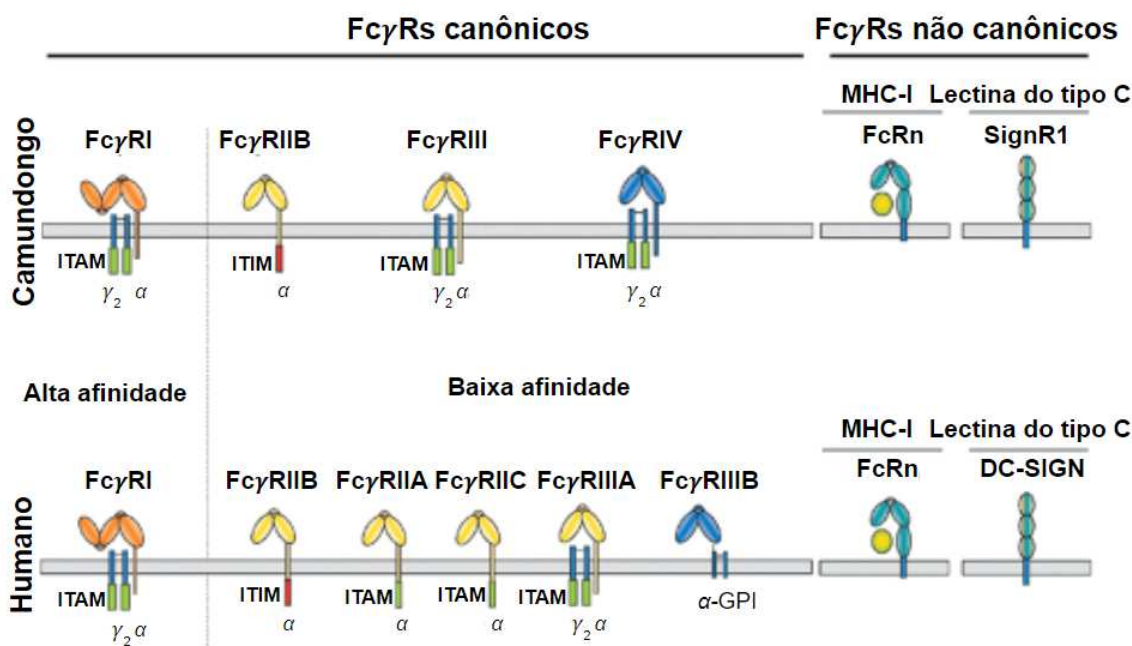
A maioria dos estudos indicam a IgA como um marcador de patógenos, porém grande parte da IgA secretada no intestino liga bactérias sem seletividade (Gommerman et al., 2014). Em contraste, a IgG tem se mostrado mais seletiva, sendo geralmente destinada a suprimir a invasão de patógenos (Pickard et al., 2017). Níveis elevados de bactérias revestidas com IgA e IgG são um traço característico observado em doenças inflamatórias intestinais (DII) (Harmsen et al., 2012; Rengarajan et al., 2019). Segundo Rengarajan e colaboradores (2019), os subtipos de DII mostram padrões diferentes de bactérias ligadas às Igs. Pacientes com doença de Crohn (DC) apresentam elevadas proporções de bactérias ligadas a IgA e IgG, o que está relacionado ao estágio mais grave da doença. Já pacientes com colite ulcerativa (UC) apresentam aumento da quantidade de bactérias ligadas a IgG apenas. Estes resultados propõem que as Igs podem ser usadas como marcadores de DIIs.

Alguns marcadores sorológicos como anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), anticorpo citoplasmático anti-neutrófilo (ANCA), anticorpos anti-flagelina (anti-CBir1) e anti-porina de membrana externa C (anti-OmpC) estão associados ao curso da doença e aos fenótipos da DII (Schirmer et al., 2019). Estudos já demonstraram que a IgG sérica anti-flagelina é elevada em pacientes com doença de Crohn, cerca de 50% dos pacientes com DC apresentaram reatividade sérica ao anti-CBir1, enquanto os pacientes com colite ulcerativa, pacientes com outras doenças inflamatórias gastrointestinais e controles apresentam pouca ou nenhuma reatividade a essa flagelina. Este dado indica a flagelina como um importante componente para a resposta imune associada à DC. (Lodes et al, 2004;

Targan et al., 2005) Targan e colaboradores, 2005, demonstraram que o nível de resposta ao anti-CBir1 é maior em pacientes que apresentam concentrações crescentes de ASCA e anti-OmpC, o que é consistente com o conceito de que esse subconjunto de pacientes têm uma propensão a responder a múltiplos antígenos bacterianos. O anticorpo ANCA está associado à maioria dos casos de colite ulcerativa (UC), 60% a 70% dos pacientes com UC e apenas 25% dos pacientes com doença de Crohn produzem estes anticorpos específicos. No trabalho de Cohavy e colaboradores, 2000, sugere-se que o ANCA identificasse um ou mais antígenos expressos por bactérias residentes no cólon, definindo alvos microbianos da resposta imune associada à doença. Estes trabalhos demonstraram também que a IgG anti-OmpC está elevada em pacientes com UC em comparação com controles saudáveis. Diversas associações entre marcadores sorológicos e DIIs já foram traçadas, contudo ainda não foi visto uma associação específica entre o perfil sorológico e a microbiota dos hospedeiros. Neste trabalho focaremos nos marcadores sorológicos das IgGs anti-OmpC, Anti-CBir1 e ANCA.

A IgG é uma imunoglobulina definida como uma glicoproteína de 150 kDa, composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. As cadeias pesadas são compostas por um domínio variável ( $V_H$ ) e três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). As cadeias leves consistem em um domínio variável ( $V_L$ ) e um domínio constante (CL). A porção Fab (fragmento de ligação ao antígeno) responsável pela interação específica entre o antígeno e a IgG, é formada pelas cadeias  $V_H$  e CH1,  $V_L$  e CL. Já a porção Fc ("fragmento cristalino") é formado pelos domínios CH2 e CH3 (Zeng et al., 2016; Thomson, 2016). A IgG humana é dividida nas subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, numerados de acordo com sua quantidade no soro e baseadas nas diferenças antigênicas na estrutura da cadeia pesada (Smith et al., 2019). Ela pode mediar três principais mecanismos efetores. A primeira forma é através da neutralização de patógenos e/ou toxinas onde a IgG liga-se às proteínas de superfície do microrganismo alvo e neutraliza a capacidade de entrar nas células do hospedeiro e sua replicação. A segunda é por meio da ativação do sistema complemento (Smith et al., 2019; Tortora et al., 2017; Thomson, 2016). E a terceira, a opsonização de patógenos que se replicam fora das células: a porção Fab da IgG se liga aos antígenos, a porção Fc associa-se com receptores  $Fc\gamma R$  e desencadeiam as respostas das células efetoras, como macrófagos e neutrófilos, para a proteção contra a infecção (Bournazos et al., 2020; Thomson, 2016; Daëron, 2014).

Os Fc $\gamma$ R são receptores para a região constante (Fc) das imunoglobulinas IgG (Wang e Jönsson, 2019). Estes receptores são divididos em dois grupos principais: tipo I e tipo II. Fc $\gamma$ R tipo I, foco deste trabalho, incluem receptores canônicos classificados como ativadores ou inibidores, com base nos motivos de sinalização em seu domínio intracelular (Figura 1). Nos humanos, os principais Fc $\gamma$ Rs de ativação são Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIc e Fc $\gamma$ RIIIa. Estes contêm motivos de ativação de tirosina-imunorreceptor (ITAMs) presentes na cadeia  $\alpha$  do domínio intracelular de Fc $\gamma$ R (para Fc $\gamma$ RIIa e Fc $\gamma$ RIIc) ou na cadeia Fc $\gamma$  associada, necessária para a expressão e sinalização de Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RIIIa. Os ITAMs são responsáveis pela expressão do receptor, montagem de superfície e sinalização. O Fc $\gamma$ RIIB é o único Fc $\gamma$ R tipo I inibidor e é codificado por FCGR2B e contém um motivo inibidor de tirosina-imunorreceptor (ITIM) em sua região citoplasmática (Bournazos e Ravetch, 2017; Bournazos et al., 2020). Ele é essencial para regular o limiar de ativação de células da linhagem linfóide (células B), regulando as respostas de anticorpos e mantendo a tolerância (Bournazos e Ravetch, 2017). Apenas o Fc $\gamma$ RIIIb não apresenta domínios de transdução de sinal (ITAM ou ITIM), ele é expresso como uma proteína ancorada a GPI (glicosilfosfatidilinositol). Contudo, ainda é capaz de transduzir sinais de ativação por meio da reticulação do receptor, especialmente através da associação e sinergia com receptores ativadores como o Fc $\gamma$ RIIa (Unkeless et al., 1995; Zhou and Brown, 1994). Já os Fc $\gamma$ R tipo II pertencem à família de receptores de lectina do tipo C, como CD23 e DC-SIGN (ou CD209), que apresentam uma estrutura oligomérica estabilizada por uma haste helicoidal  $\alpha$  na região extracelular de ligação ao ligante (Pincetic et al., 2014; Bournazos e Ravetch, 2017). Além dos Fc $\gamma$ Rs temos os FcRs neonatais (FcRn) responsáveis por modular a meia-vida e a reciclagem de IgG (Ghetie e Ward, 2000). O FcRn se liga à porção Fc de IgG com alta afinidade (Daëron, 2014).



**Figura 1. Receptores Fc $\gamma$ R canônicos e não canônicos de humanos e murinos.** Em ambas as espécies, os Fc $\gamma$ R canônicos se diferem em receptores de alta ou baixa afinidade pela porção Fc da imunoglobulina G e pelas vias de sinalização que desencadeiam, sendo elas de ativação ou inibição. Com exceção de Fc $\gamma$ RIIA e Fc $\gamma$ RIIC humanos, um Fc $\gamma$ R ativador geralmente consiste em uma cadeia  $\alpha$  de ligação ao ligante e um dímero de cadeia  $\gamma$  transdutora de sinal, que contém motivos ativadores baseados em tirosina imunorreceptor (ITAMs). Em humanos, também há um receptor capaz de transduzir sinais de ativação sem o ITAM, denominado Fc $\gamma$ RIIIB. Este receptor é ligado ao glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Em relação aos Fc $\gamma$ R inibidores, o único é o Fc $\gamma$ RIIB, ele apresenta uma cadeia única que contém um motivo inibitório baseado em tirosina imunorreceptor (ITIM) em seu domínio citoplasmático. O FcR neonatal não canônico é membro da família das proteínas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e responsável pela regulação da meia-vida da imunoglobulina G. SIGNR1 de camundongo ou DC-SIGN humano são proteínas lectinas do tipo C que se ligam a glicoformas de IgG ricas em resíduos terminais de ácido siálico e estão envolvidas na atividade anti-inflamatória da IgG. Imagem e legenda retirada e adaptada da referência Bournazos e Ravetch, 2017.

A maioria das células efetoras são capazes de expressar tanto Fc $\gamma$ R ativadores quanto inibidores. E as sinalizações opostas destes receptores determinam o resultado na

inflamação mediada por IgGs, para atingir respostas celulares equilibradas (Bournazos et al., 2020). A expressão dos Fc $\gamma$ R é modulada pelas citocinas, onde citocinas pró-inflamatórias geram aumento da expressão de Fc $\gamma$ Rs de ativação e os sinais anti-inflamatórios regulam negativamente a ativação de Fc $\gamma$ Rs, aumentando a expressão de Fc $\gamma$ RIIB (Bournazos et al., 2017). A especificidade e afinidade da ligação da porção Fc com os diferentes Fc $\gamma$ Rs são definidos pela sequência de aminoácidos primária das classes e subclasses de IgG, assim como estrutura e composição da porção Fc (Bournazos et al., 2020). Os Fc $\gamma$ RI são receptores de alta afinidade e apresentam três domínios extracelulares enquanto Fc $\gamma$ RII e Fc $\gamma$ RIII se ligam com menor afinidade por possuírem apenas dois domínios extracelulares (Lu et al., 2011).

Em camundongos há quatro diferentes subclasses de IgG, sendo elas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, que se ligam com afinidade e especificidade variadas a diferentes receptores Fc $\gamma$ R. Assim como em humanos, nos camundongos, os tipos de Fc $\gamma$ R são classificados em ativadores como Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII e Fc $\gamma$ RIV e inibidores, Fc $\gamma$ RIIB. Interessantemente, Fc $\gamma$ RIIB é conservado em camundongos e humanos. Em humanos, IgG1 e IgG3 são as subclasses de IgG mais pró-inflamatórias. Em camundongos, no entanto, IgG2a e IgG2b são as moléculas de IgG mais pró-inflamatórias e mostram uma atividade maior do que IgG1 e IgG3 de camundongo em modelos *in vivo* (Nimmerjahn e Ravetch, 2008). As linhagens de camundongo knockout disponíveis para determinados receptores Fc e camundongos transgênicos com FcR humanos oferecem oportunidades para o estudo da biologia destes receptores tanto em camundongos quanto em humanos (Masuda et al., 2009).

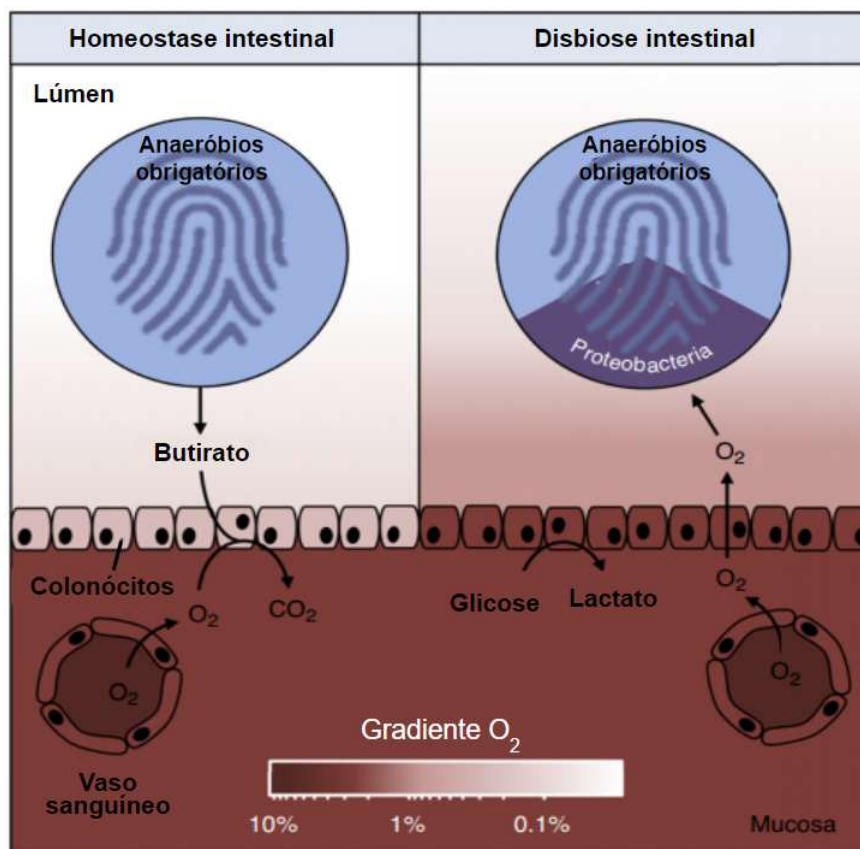
A microbiota intestinal induz a produção de IgG capazes de se ligarem de maneira cruzada a membros da família Enterobacteriaceae patogênicas para conferir proteção contra infecções sistêmicas, desempenhando um papel importante na formação do microbioma intestinal e na imunidade contra patógenos entéricos Gram-negativos desde o início da vida até a idade adulta (Amir et al., 2022). Alguns autores como Castro-Dopico e Clatworthy mostraram que a IgG anti-microbiana é um componente central durante a resposta inflamatória intestinal em modelos de DII, como colite induzida por DSS, e infecção de mucosa, identificando potenciais estratégias terapêuticas para DII. Contudo, IgG e Fc $\gamma$ Rs desempenham papéis essenciais também no processo de regulação da resposta imune e controle da expansão de bactérias comensais (Castro-Dopico e Clatworthy, 2019). Ainda

são necessários novos estudos para elucidar melhor os sinais e mecanismos que determinam a geração dessas respostas de IgG à microbiota em diferentes contextos.

### **1.3 Disbiose intestinal – desenvolvimento da colite ulcerativa e efeito do óxido nítrico**

Uma interação fina entre o hospedeiro e a microbiota determina o resultado da saúde ou doença. Dada a ampla gama de efeitos na fisiologia do hospedeiro e seu papel na indução, educação e função do sistema imunológico, de acordo com o grau de intensidade da perturbação na microbiota, pode-se acabar gerando doenças relacionadas ao intestino, como doenças inflamatórias intestinais (DII) e distúrbios metabólicos, bem como em doenças que afetam outros sistemas, incluindo aterosclerose, autismo, asma e diabetes tipo I (Dieterich et al., 2018; Schirmer et al., 2019).

O desequilíbrio da microbiota intestinal, ou perda da sua homeostase, é chamado de disbiose, sendo responsável por inúmeros quadros patológicos no organismo. A disbiose gera uma modificação nas respostas imunes, favorecendo um estado de inflamação (Mota et al., 2018). Também é capaz de alterar a sensibilidade visceral, permeabilidade e motilidade intestinais (Passos e Moraes-Filho, 2017). Conforme ilustrado na figura 2, durante a disbiose, observamos uma perda drástica da diversidade e redução no número de bactérias principalmente dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Em consequência dessa redução, ocorre perda da função de barreira contra colonização, exercida pela microbiota, levando a uma expansão de bactérias encontradas em menor abundância em condições de eubiose, especialmente do filo *Proteobacteria*, bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas. Essa expansão envolve a alteração do microambiente metabólico intestinal favorecendo organismos capazes de realizar respiração aeróbica e anaeróbica (Litvak et al., 2017). O lúmen do cólon saudável é anaeróbico, o que promove uma dominância de anaeróbios obrigatórios na composição da microbiota intestinal. O epitélio do cólon (colonócitos) é hipóxico, porém processos inflamatórios ou tratamento com antimicrobianos aumentam a oxigenação local, levando a interrupção da anaerobiose e favorecendo a respiração aeróbica de bactérias disbióticas (Litvak et al., 2017), como ilustrado na figura 3.

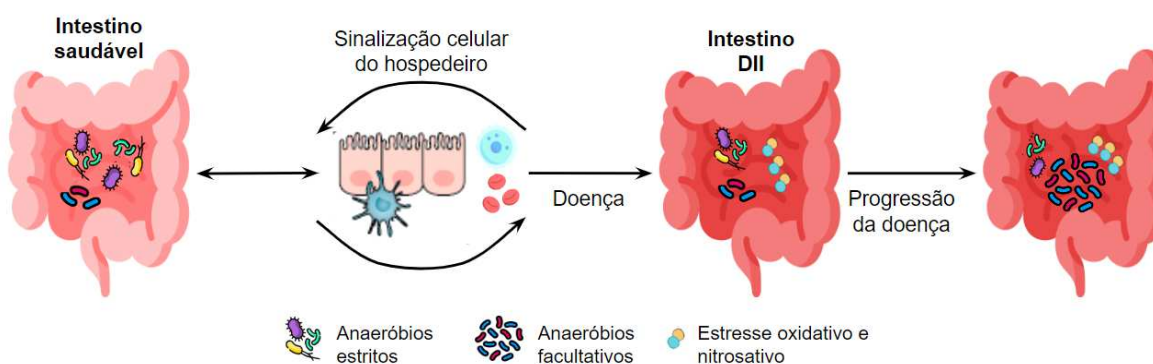


**Figura 2. Interrupção da anaerobiose no epitélio e lúmen do cólon durante a disbiose intestinal.** Na homeostase intestinal (esquerda), a  $\beta$ -oxidação do butirato derivado da microbiota causa hipóxia epitelial, que mantém a anaerobiose no lúmen do intestino grosso. Enquanto na disbiose intestinal (direita), os colonócitos superficiais obtêm energia por glicólise, processo anaeróbico, levando ao aumento da oxigenação. Este processo interrompe a anaerobiose no lúmen, gerando assim a expansão das Proteobactérias, anaeróbicas facultativas. A escala de cores mostrada na parte inferior (gradiente de  $\text{O}_2$ ) indica a disponibilidade de oxigênio. Imagem e legenda retirada e adaptada da referência Litvak et al., 2017.

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças polimicrobianas e multifatoriais, caracterizadas por uma combinação de alterações microbianas, respostas imunes anormais e uma barreira mucosa intestinal debilitada, levando a perturbação das interações microbianas com o hospedeiro (Xavier e Podolsky, 2007). Segundo Schirmer e colaboradores (2019), a inflamação associada à DII é impulsionada pelo desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Se manifestam em duas formas

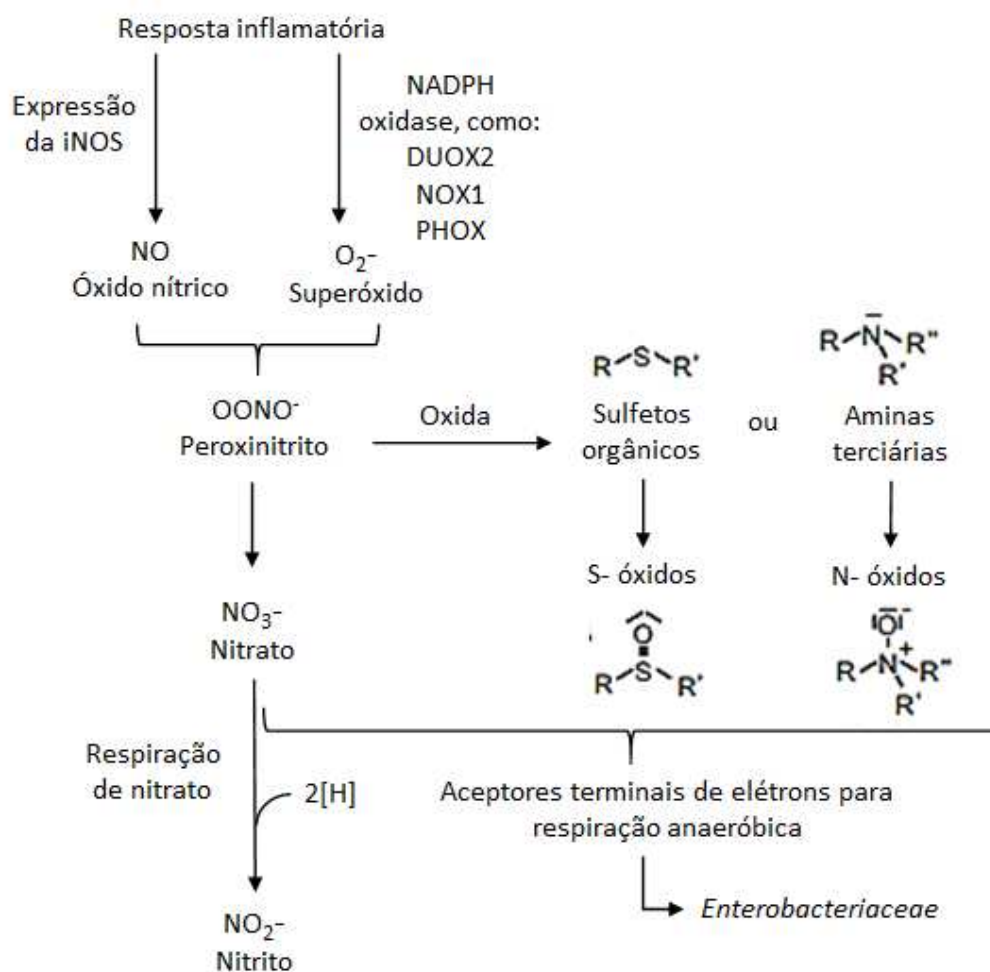
principais: colite ulcerativa (UC), que se estende proximalmente ao reto e é restrita ao cólon, e doença de Crohn (DC) que pode afetar qualquer local no trato gastrointestinal, mas comumente ocorre no íleo terminal e pode ser descontínua. A UC se apresenta com micro-abscessos compostos por neutrófilos dentro da lâmina própria e criptas intestinais. Macroscopicamente, há desenvolvimento de extensas ulcerações na mucosa. Além dessas características, também é observado o envolvimento de células imunológicas na UC, principalmente um fenótipo de célula T auxiliar tipo 2 com produção de TGF- $\beta$  e IL-5, mas não IL-4 (Schirmer et al., 2019).

Pacientes com DII, como colite ulcerativa possuem uma microbiota menos diversa que indivíduos saudáveis (Cleynen et al., 2016), conforme é ilustrado na figura 3. A principal redução ocorre em populações de bactérias do filo Firmicutes, como membros de *Clostridium* IV e XIV. E ocorre um aumento da abundância de representantes das Proteobactérias, especialmente da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli* (Rajilić-Stojanović et al., 2013). Diversos mediadores estão sendo apontados como possíveis participantes na patogênese da resposta inflamatória. O óxido nítrico é um dos possíveis fatores etiológicos propostos nas DII (Ljung et al., 2006).



**Figura 3. Doença inflamatória intestinal e microbiota.** O intestino saudável apresenta a composição bacteriana intestinal (anaeróbios e anaeróbios facultativos) em equilíbrio com a fisiologia do hospedeiro. Alterações na composição do microbioma intestinal durante a doença incluem diversidade microbiana reduzida e expansão de anaeróbios facultativos devido ao aumento do estresse nitrosativo e oxidativo no intestino. Imagem e legenda retirada e adaptada da referência Schirmer et al., 2019.

O óxido nítrico (NO) está envolvido em muitos processos patológicos e fisiológicos. Ele é formado pela ação de enzimas óxido nítrico sintase (NOS) sobre o aminoácido L-arginina (L-Arg). Diante de estímulos imunogênicos a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) tem sua expressão acentuada em células inflamatórias. Em níveis adequados, a iNOS promove uma proteção contra infecções, contudo altas concentrações exercem efeitos patológicos (Kamalian et al., 2020). Preliminarmente, a iNOS é ativada pelos estímulos imunogênicos e também por citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  (Soufli et al., 2016). Após transcrita e traduzida, iNOS gera altos níveis de NO, levando a efeitos tóxicos e danosos no tecido saudável (Palatka et al., 2005). Além disso, o NO induz indiretamente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Conforme é ilustrado na figura 4, a interação de NO com ânion superóxido gera peroxinitrito, OONO $^-$  (Kamalian et al., 2020; Palatka et al., 2005). O OONO $^-$  pode gerar nitrato (NO $_3^-$ ) ou oxidar sulfetos orgânicos e aminas terciárias, produzindo assim S-óxidos e N-óxidos (Winter et al., 2013). OONO $^-$  é um oxidante para diversas moléculas biológicas, levando ao aumento da permeabilidade epitelial do intestino, contribuindo para o dano tecidual e aumento da regulação da resposta inflamatória (Kamalian et al., 2020; Palatka et al., 2005).



**Figura 4. Modelo proposto para a geração de aceptores de elétrons respiratórios durante a inflamação intestinal.** Um componente importante da resposta inflamatória do hospedeiro é a geração de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Concentrações elevadas de óxido nítrico (NO) são detectadas no lúmen do cólon de indivíduos com doenças inflamatórias intestinais. Reações de radicais NO com superóxido produz peroxinitrito e este é o precursor de nitrato, S-óxidos e N-óxidos. Como demonstrado no modelo, ROS derivados de inflamação podem gerar S-óxidos e N-óxidos. Desta forma, a colite produz disbiose pois subprodutos altamente oxidados da inflamação intestinal (como o nitrato, S-óxidos e N-óxidos) permitem que *Enterobacteriaceae* comensais ocupem o nicho de microrganismos fermentadores no lúmen intestinal usando respiração anaeróbica para produção de energia. Imagem adaptada da referência Winter et al., 2013.

Muitos trabalhos mostram evidências do aumento na produção de óxido nítrico e uma grande expressão de iNOS no cólon de pacientes com DIIs (Kamalian et al., 2020; Ljung et al., 2006). Na colite, alguns sinais, como aumento de permeabilidade vascular, vasodilatação na mucosa e distúrbios de motilidade são associados direta ou indiretamente com efeitos do NO (Ljung et al., 2006). Como dito anteriormente, durante a disbiose, a perda drástica da diversidade leva à expansão, especialmente, de bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas, como as Enterobacteriaceae. Estas bactérias são capazes de utilizar tanto o nitrato quanto os S-óxidos e N-óxidos como aceptores terminais de elétrons para respiração anaeróbica (Winter et al., 2013). Desta forma, o excesso de NO produzido durante a colite pode favorecer a expansão da população de membros desta família.

Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que animais nocautes para célula B ( $Mu^{-/-}$ ) e animais nocautes para o receptor inibitório de IgG são mais susceptíveis a colite e apresentam maior translocação bacteriana. Contudo, este fenótipo é revertido através da administração de antimicrobianos, sendo que nos animais  $Mu^{-/-}$  o fenótipo também é revertido pela administração IgG purificada do soro de animais selvagens. Já animais nocautes para o receptor de ativação  $Fc\gamma RIII$  não apresentaram este perfil de susceptibilidade acentuada. Por fim, foi demonstrado que os animais  $Fcgr2b^{-/-}$  apresenta um expressão de iNOS adiantada e a inibição da enzima reverte a maior susceptibilidade a colite, reduzindo a translocação bacteriana (Fagundes, 2021). Estes dados sugerem que a IgG pode regular a produção de NO, via a ativação de receptores  $Fc\gamma R$  e que a produção de NO está envolvida na translocação microbiana durante a colite ulcerativa.

Esses achados apontam que a IgG pode desempenhar um papel no controle e resolução da disbiose intestinal durante doenças inflamatórias intestinais. Desta forma, o objetivo desse trabalho é avaliar se a IgG regula a produção de óxido nítrico e se isso tem impacto na expansão e translocação de anaeróbios facultativos durante o processo disbiótico gerado pela colite ulcerativa. A hipótese do presente trabalho é que IgG é capaz de controlar essa produção de NO pelo hospedeiro e levar a uma menor expansão e translocação de linhagens bacterianas que utilizam o nitrato durante a respiração anaeróbia. Outra hipótese levantada ao longo deste trabalho foi que o perfil sorológico do hospedeiro seria capaz de favorecer a expansão ou redução de alguns gêneros bacterianos por interferir na resposta inflamatória do hospedeiro. Visamos testar esta hipótese por meio de análise de dados multi-ômicos, experimentos *in vitro* com isolados disbióticos e experimentos *in vivo* em

modelo murino de colite ulcerativa utilizando animais deficientes para o receptor Fc $\gamma$ RIIB submetidos a ensaios de competição entre bactérias selvagens e mutantes incapazes de utilizar nitrato na respiração anaeróbia.

## **2 Justificativa**

As doenças inflamatórias intestinais, como a colite, induzem um processo inflamatório e, conseqüentemente, disbiose da microbiota, levando a exposição de novos antígenos ao sistema imunológico. Os trabalhos de Adolph e colaboradores (2022) e Agrawal e Jess (2022), demonstraram que estas doenças estão associadas a complicações como internações, cirurgias, infecções e câncer, e estão se espalhando em escala global durante o processo de ocidentalização do estilo de vida e mudanças nos hábitos alimentares ocorridos nas últimas décadas. O desenvolvimento de novas intervenções clínicas, medicamentos e a melhoria da estratégia de tratamento por meio da implementação de medicina personalizada são necessários para alcançar o controle ideal das DIIs.

Vários estudos já descreveram a importância da IgA tanto na proteção quanto na resolução de processos disbióticos (Bunker et al., 2018; Zheng et al., 2020). Esta imunoglobulina também atua na manutenção da homeostase e controle da composição microbiana. Alguns trabalhos têm demonstrado que algumas IgGs circulantes são induzidas pelo microbioma e podem estar envolvidas na inflamação intestinal (Cisalpino et al., 2017). Também já foram observadas evidências que IgGs controlem a expansão de patógenos no lúmen do cólon e a translocação bacteriana para a corrente sanguínea (Chistiakov et al., 2015). Os trabalhos descritos acima sugerem que em processos inflamatórios as IgGs podem modular a homeostase da microbiota intestinal.

Diante disso, este trabalho visa compreender a associação entre a resposta humoral e a composição microbiana no hospedeiro, propondo que a IgG teria um papel importante no controle da produção do Óxido Nítrico durante doenças inflamatórias intestinais em pacientes e em modelo murino, favorecendo determinados táxons em detrimento de outros. Nesse contexto, as análises multi ômicas conjugadas a estudos *in vitro* e em modelo animal oferecem subsídios importantes para compreender os mecanismos imunes, celulares e microbiológicos que impactam no fenótipo manifestado durante as DIIs. Dessa forma, este estudo gera conhecimentos cruciais para embasar novos alvos de potencial terapêutico para o controle da homeostase da microbiota intestinal nas doenças inflamatórias intestinais.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto gerado por IgG na composição microbiana e consequente suscetibilidade às doenças inflamatórias intestinais

#### 3.2 Objetivos específicos

I. Por meio de análises de dados multi-ômicos, avaliar:

- Associação entre parâmetros sorológicos e composição da microbiota em pacientes com DIIs ou não;
- Associação entre expressão gênica e parâmetros sorológicos em pacientes com DIIs ou não;

II. Caracterizar o perfil de IgG anti-microbiota em animais WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>;

III. Avaliar em que tipos celulares se dá a expressão de iNOS em animais selvagens e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos ao modelo de colite ulcerativa;

IV. Demonstrar que isolados disbióticos de animais submetidos à colite são capazes de usar nitrato como acceptor final de elétrons, *in vitro*;

V. Avaliar se o uso de nitrato como acceptor final de elétrons confere alguma vantagem competitiva para bactérias, favorecendo a expansão da população bacteriana e translocação durante a colite ulcerativa em animais selvagens e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>;

VI. Determinar se a inibição de iNOS altera a expansão da população e a translocação de bactérias que utilizam nitrato como acceptor final de elétrons após a colite ulcerativa em animais selvagens e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>.

## 4 Metodologia

### 4.1 Abordagens bioinformáticas

#### Análise de dados multi-ômicos

Foram realizadas análises de dados disponíveis no site <https://ibdmdb.org/>. Este site abriga um banco de dados multi-ômicos de doenças intestinais inflamatórias (IBDMDB), aberto para uso da comunidade. Nosso projeto foca no estudo denominado HMP2 e utilizamos os seguintes tipos de dados: 16S, metagenoma, metatranscriptoma, transcriptoma do hospedeiro e sorologia. Os métodos de coleta e geração de dados, além dos dados processados e brutos também estão disponíveis no trabalho principal publicado (Lloyd-Price et al., 2019). O IBDMDB foi escolhido devido sua riqueza de informação, que fornece um recurso integrado para analisar o ecossistema microbiano intestinal no contexto das DIIs.

A análise dos dados selecionados do IBDMDB foi realizada no IDE RStudio Desktop 2021.09.0+351. Realizamos as análises de diversidade utilizando o pacote “phyloseq” disponível no software R. O phyloseq é uma ferramenta de software de código aberto para análise estatística de dados de sequenciamento filogenético. Ele fornece um conjunto de classes e ferramentas para facilitar a importação, armazenamento, análise e exibição gráfica dos dados do microbioma. O pacote phyloseq está disponível em <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/phyloseq.html> (McMurdie e Holmes, 2013). A diversidade alfa em nível de espécie foi realizada utilizando a função `estimate_richness`. E para diversidade beta foi utilizada a função do mesmo pacote, com os parâmetros `method="PCoA"`, `distance=dist_bray` e `distance=dist_js`. A partir de dados gerados pelo phyloseq utilizamos o “DESeq2 package” para calcular a abundância relativa taxonômica. O DESeq2 é uma ferramenta para análise diferencial de dados de contagem, usando estimativa de encolhimento para dispersões e mudanças de dobra para melhorar a estabilidade e interpretabilidade das estimativas. A análise de genes diferencialmente expressos também foi realizada utilizando o programa DESeq2. Os gráficos referentes às análises dos genes diferencialmente expressos, enriquecimento e todas as demais análises e representações gráficas foram construídos através dos pacotes: EnhancedVolcano, ridgeplot, ggplot2, dotplot e cnetplot. O pacote DESeq2 está disponível em <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html> (LOVE et al., 2014).

## 4.2 Estudos *in vitro* com isolados disbióticos

### Descrição de isolados disbióticos de Enterobacteriaceae e linhagens padrão de *Escherichia coli*

Os isolados disbióticos utilizados estão depositados no biobanco do LIMHO e foram obtidos de amostras de fezes e do fígado de camundongos selvagens, *Mu*<sup>-/-</sup> ou *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> que passaram ou não pela exposição a DSS. Estas amostras foram diluídas em solução de NaCl 0,9% p/v estéril e cultivadas nos meios sólidos seletivos de MacConkey. Posteriormente as amostras foram devidamente preparadas para o armazenamento no freezer a -80°C (Fagundes, 2021).

As linhagens padrão de *E. coli* foram estabelecidas por Winter et al., 2013, sendo gentilmente cedidas pelo Dr. Andreas Baumler (UC-Davis, USA). A linhagem *E. coli* 129 é derivada da linhagem *E. coli* HS, derivada de um isolado comensal humano, e possui resistência a Canamicina. Esta linhagem foi utilizada como cepa controle para o ensaio de índice de competição e a partir daqui passaremos a denominar esta linhagem apenas como *E. coli* HS. A linhagem *E. coli* 938 também foi derivada da *E. coli* HS, contudo esta linhagem é uma mutante para nitrato redutases (*narG*, *napA* e *narZ*) e possui resistência a ampicilina (Winter et al., 2013). A partir daqui passaremos a denominar esta linhagem como *AnarGnapAnarZ*. O cultivo destas linhagens foi realizado utilizando Ágar MacConkey ou caldo LB contendo antimicrobianos (como canamicina, 50 µg/ml ou ampicilina a 100 µg/ml) para qual uma das linhagens possui resistência.

As amostras foram preparadas para o armazenamento seguindo os seguintes passos: Colônias isoladas dos meios seletivos foram adicionadas em caldo LB (ou caldo LB com antibiótico para as linhagens padrões) e incubadas em agitação a 37°C durante 24h. Após centrifugar e ressuspender as células em meio de criopreservação, foram obtidas alíquotas para o congelamento a -80°C.

### Condições de crescimento dos isolados

As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) ou LB suplementado com nitrato (10 mM). Usamos tubos de cultura Pyrex com tampa de rosca de

15mL. Foram inoculadas  $10^8$  CFU no meio de crescimento. Para o crescimento anaeróbio, os tubos (com toda a capacidade ocupada) foram vedados e incubados sem agitação, a  $37^\circ\text{C}$ . O  $\text{O}_2$  residual dissolvido no meio de crescimento é rapidamente consumido pelas bactérias inoculadas, resultando em um ambiente anaeróbio para multiplicação e crescimento celular. O crescimento aeróbio é obtido por meio de inoculação em tubos com tampa solta e frascos com caldo LB não excedendo 1/4 do volume total, incubados a 200 rpm de agitação a  $37^\circ\text{C}$  (Zhang et al., 2011; Lai et al., 2017). O crescimento foi monitorado de hora em hora durante 10 horas, seguido de uma leitura final no ponto de 24h após incubação, por meio da leitura na densidade óptica de 600nm. O sobrenadante foi coletado para quantificação de nitrito e indol nos pontos de 2, 4, 6, 10 e 24 horas pós-inoculação.

### **Opsonização de isolados disbióticos e marcação das células bacterianas para ensaio de deposição de IgG do soro**

Os isolados bacterianos disbióticos foram crescidos em caldo LB e os tubos de cultivo foram então centrifugados a 3000g por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, descartamos o sobrenadante e adicionamos 2mL de PBS-BSA-Azida (PBS contendo 1% BSA e 0,05% Azida), processo que foi repetido por mais duas vezes. Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos as células na proporção de  $1 \times 10^7$  células por mL em PBS-BSA-Azida. Os isolados foram opsonizados através da incubação com soro de camundongos selvagens ou *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> sem inativação prévia (25 $\mu\text{L}$  de soro diluído 1:25 acrescido a 25 $\mu\text{L}$  de suspensão de bactérias), por 30 minutos a temperatura ambiente em uma placa de 96 poços de fundo côncavo. Após a opsonização, foi adicionado 150 $\mu\text{L}$  de PBS-BSA-Azida, seguido de centrifugação a 3000g por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . A placa foi flicada e adicionou-se 25 $\mu\text{L}$  de um anticorpo Anti-IgG de camundongos conjugado a Alexa Fluor-647, seguido de incubação por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  ao abrigo da luz. Após a incubação e lavagem, células bacterianas foram fixadas pela ressuspensão em 150 $\mu\text{L}$  de uma mistura de PBS-formaldeído 2% v/v, seguido de incubação por 20 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após novo ciclo de lavagem, as células foram permeabilizadas pela ressuspensão em 150 $\mu\text{L}$  de tampão de permeabilização (110 mM de ácido cítrico; 4.1mM Tween 20) e incubação por 20 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação e remoção do tampão, as células bacterianas foram ressuspendidas em 200 $\mu\text{L}$  de PBS contendo 1 $\mu\text{M}$  de DAPI. Após Incubação

por pelo menos 1 hora a 4°C ao abrigo da luz, as amostras foram adquiridas no citômetro FACSCanto II (BD biosciences) e analisadas no software FlowJo (Tree Star Inc).

### **Quantificação de nitrito pelo método de Griess**

Para a quantificação de nitrito foi utilizado o teste de Griess nos sobrenadantes de culturas bacterianas previamente coletados. Em uma placa de ensaio de 96 poços foi adicionado 100 µL do sobrenadante das culturas em duplicata, seguido de 50 µL do reagente de Griess à temperatura ambiente. O reagente é composto por N- (1-Naftil) Etil-Enodiamina a 0.4 mM e sulfanilamida a 6mM em solução de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 2,5% p/v. Para a confecção de uma curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio a 10 mM passou por diluições seriadas, sendo o primeiro ponto da curva uma concentração de 2 mM e o último, uma concentração de 15,6 uM de nitrito de sódio. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 540 nm. As absorbâncias das diferentes amostras foram comparadas com a curva-padrão, e os resultados obtidos foram expressos em uM como a média da duplicata.

### **Quantificação de Indol**

Para a quantificação de indol foi também confeccionada uma curva-padrão usando indol a 10mM que passou por diluições seriadas. O primeiro ponto da curva continha uma concentração de 2mM e o último ponto, uma concentração de 15,6 uM de indol. Em uma placa de 96 poços com fundo côncavo, foi adicionado 160 µL do sobrenadante das culturas, a curva e o branco (meio de cultura não inoculado) em duplicata, seguido de 10 µL de ácido tricloroacético 30% p/v. Após incubação a 50°C por 30 minutos sob agitação. Após centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato. Após a transferência, foi adicionado 100 µL de reagente de Erlich (4-(dimetilamino)-benzaldeído 1,2% p/v em ácido acético glacial) e, após incubação de 10 minutos a temperatura ambiente sob agitação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. As absorbâncias das diferentes amostras foram comparadas com a curva-padrão, e os resultados obtidos foram expressos em uM como a média da duplicata.

### 3.3 Estudos *in vivo*

#### Animais

Foram utilizados camundongos geneticamente modificados deficientes para o receptor *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> obtidos do biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e camundongos selvagens C57/BL6 obtidos do biotério de Central da UFMG, fêmeas de 8-10 semanas de idade. Os animais foram mantidos em microisoladores (Alesco) contendo maravalha autoclavada e alocados em estantes de ventilação, sob temperatura controlada (23°C), ciclos de iluminação de 12 horas e livre acesso à ração e água filtrada. Cada grupo era composto por um número de 3 a 5 animais variando de acordo com o experimento a ser realizado. Todos os procedimentos experimentais deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG, número do CEUA 258/2020.

#### Indução da colite

Para a indução da colite em animais selvagens e em animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> foi utilizado sulfato de sódio dextrana (DSS) na concentração de 2,5% (p/v) em água de beber durante 8 dias (Fagundes, 2021). Cada gaiola recebia 50mL de solução com reposições a cada dois dias.

#### Tratamento com aminoguanidina

Os animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> foram expostos a aminoguanidina, inibidor de iNOS (AG, Sigma-Aldrich) na concentração de 1 mg/ml adicionada à água de beber ou à solução de DSS 2,5% p/v a partir do terceiro dia, até o oitavo dia do protocolo experimental (Fagundes, 2021). Cada gaiola recebia 50mL de solução com reposições a cada dois dias.

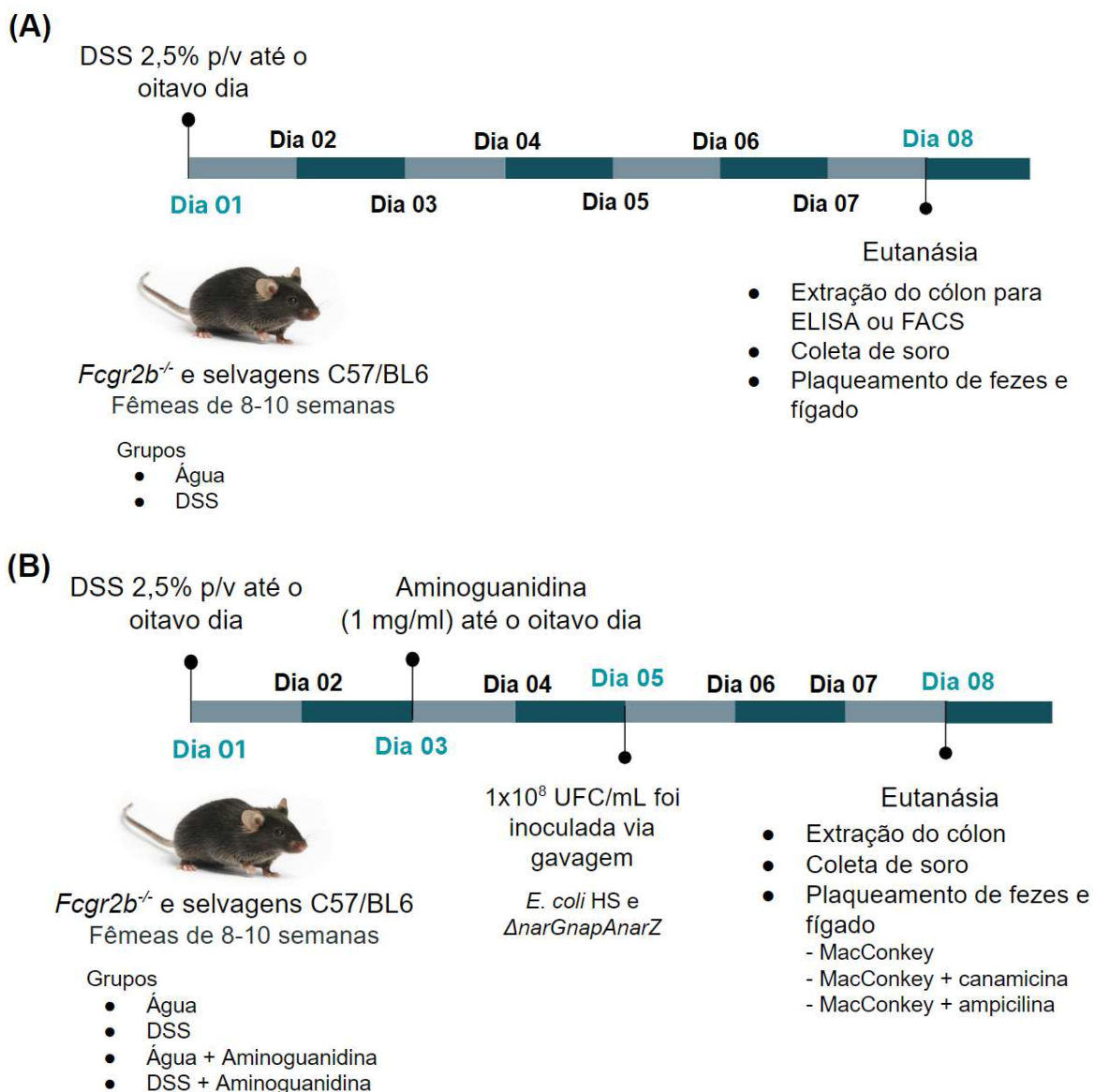
#### Exposição dos animais a linhagens de *E. coli* e ensaio de competição

Foi induzida colite nos animais selvagens e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> com a solução de DSS 2,5% p/v na água de beber e, no quarto dia do protocolo experimental os animais foram inoculados com as linhagens de *E. coli* selvagem (HS, resistente a canamicina) e mutante para utilização de nitrato como acceptor final de elétrons (*AnarGnapAnarZ*, resistente a ampicilina) de

maneira semelhante à descrita por Lai et al., 2017. Após o crescimento overnight em caldo LB, as culturas de cada uma das linhagens foram quantificadas pela medição da OD600. As bactérias crescidas foram diluídas para uma concentração de  $1 \times 10^7$  CFU/animal e inoculadas por via oral através de gavagem (100  $\mu$ L por animal). Cada animal recebeu, simultaneamente, o mesmo número de CFUs das linhagens selvagem e mutante. No oitavo dia do protocolo experimental, as fezes e fígado foram coletados e semeadas em placas de Ágar MacConkey contendo antimicrobianos (como canamicina, 50  $\mu$ g/ml ou ampicilina a 100  $\mu$ g/ml) para qual uma das cepas possui resistência e placas sem antimicrobiano. O índice de competição foi expresso como a razão do número de CFUs de *E. coli* HS pelo número de CFUs de *E. coli* mutante.

### **Desenho experimental**

Foram realizados dois protocolos envolvendo o modelo de indução de colite com DSS. No primeiro protocolo, definimos dois grupos para cada genótipo de animais (WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>): grupo controle, onde o animal recebia apenas água, e grupo DSS, onde era colocado na água destes animais 2,5% p/v de DSS. Para esses experimentos utilizamos grupos de 3-5 animais por grupo (figura 5A); No segundo protocolo, realizamos um ensaio de competição utilizando as linhagens padrões de *E. coli* descritas anteriormente. Para este experimento, definimos dois grupos para os animais selvagens, sendo eles grupo controle (WT H<sub>2</sub>O) e grupo DSS (WT DSS) e quatro grupos para os animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, sendo eles grupo controle (*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>H<sub>2</sub>O), controle aminoguanidina (*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>AG), grupo DSS (*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>DSS) e DSS com tratamento com aminoguanidina (*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>DSS+AG). Novamente utilizamos grupos de 3-5 animais por grupo (figura 5B). Além disso, todos os animais desse experimento receberam um gavagem de uma suspensão contendo o mesmo número de células da linhagem HS e da linhagem *AnarGnapAnarZ*. Estes protocolos experimentais, com o momento de introdução da aminoguanidina e do inóculo das linhagens bacterianas, estão esquematizados na figura 5.



**Figura 5. Desenho experimental esquemático.** (A) Modelo padrão de colite ulcerativa induzida por DSS. (B) Modelo de indução de colite com ensaio de competição usando linhagens de *E. coli* e tratamento com aminoguanidina.

### **Obtenção de sobrenadante das fezes**

As fezes dos animais foram coletadas, pesadas e ressuspensas em salina estéril na proporção de 10<sup>1</sup>. Estas foram maceradas com o auxílio de uma ponteira estéril e então centrifugadas a 3000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi aliquoteado e utilizado para a detecção de sangue oculto nas fezes ou armazenado a -20°C para posterior ELISA.

### **Sangue oculto nas fezes**

Para a determinação de sangue oculto nas fezes, realizamos a reação de Meyer. O princípio do método de Meyer é a redução da fenolftaleína a anidrido ftálico pelo zinco presente no reativo. O teste foi realizado utilizando-se 50 uL do sobrenadante das fezes (em duplicata) em poços de placas 96 poços de fundo chato, seguida pela adição de 5 uL do reativo de Meyer (Renylab) e 5 uL de peróxido de hidrogênio a 3% v/v. A leitura foi realizada imediatamente após o desenvolvimento da reação colorimétrica. O comprimento de onda utilizado para leitura da absorbância foi de 540 nm.

### **Determinação do escore clínico**

Os camundongos foram monitorados e pesados inicialmente, no quinto e oitavo dia do protocolo experimental. Para isso, os animais foram colocados isolados em uma gaiola limpa sem maravilha por 10 minutos para obtenção e determinação da consistência das fezes. A presença de sangue nas fezes foi avaliada através da reação de Meyer. A pontuação foi obtida da seguinte forma: Consistência das fezes; 0 = fezes normais; 1= fezes pastosas; 2= fezes líquidas; Presença de sangue nas fezes; 0=ausente; 2=presença de sangue; Perda de peso corporal; 0=perda de até 5% do peso inicial; 1=perda entre 5 e 10% do peso inicial; 3=perda entre 10% e 20% do peso inicial; 4=perda superior a 20% do peso inicial; Sinais de morbidade; 0=sem sinais de morbidade; 1= pelos arrepiados; 2=pelos arrepiados e postura arqueada; 3=pelos arrepiados, postura arqueada e inatividade. O escore clínico corresponde a soma da pontuação para cada parâmetro e foi adaptado de Vieira et al., 2009.

### **Eutanásia e obtenção de soro**

Para eutanásia, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80mg/kg) e xilasina (15mg/kg) em tampão fosfato (PBS, 100 mcL de volume final) pela via intra-peritoneal. Após coleta de sangue pelo plexo braquial com o auxílio de uma pipeta com ponteiros heparinizadas, os animais foram então submetidos ao deslocamento cervical. Após obtenção do sangue, este foi centrifugado a 1500g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -20°C.

### **Coleta e medição do cólon**

O cólon foi delicadamente removido após eutanásia e o seu comprimento determinado, em centímetros, com auxílio de uma régua. A área determinada para medir o comprimento foi aquela entre a válvula ileocecal e o reto do trato intestinal distal. Posteriormente, o cólon também foi utilizado para quantificação de citocinas por ELISA e para citometria de fluxo para análise da expressão da enzima iNOS em leucócitos extraídos do tecido dos animais WT e *Fcgr2b<sup>-/-</sup>*.

### **Obtenção de extratos de bactérias fecais e de isolados bacterianos disbióticos**

Para a obtenção de extratos de bactérias fecais foram coletados de 8-10 pellets fecais dos animais controle ou submetidos à colite ulcerativa induzida por DSS. As fezes foram dispostas em um microtubo estéril e incubadas em banho seco à temperatura de 56°C durante 10 minutos. Em seguida, as fezes foram maceradas em 1ml de PBS. Após centrifugação a 6000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado e a fase superior formada acima do sedimento, de cor esbranquiçada, contendo células microbianas, foi ressuspensa em PBS e transferida para outro microtubo estéril. Esse procedimento foi repetido até que as células bacterianas estivessem livres de sedimentos fecais, quando foram ressuspensas em 200 µL de solução de lise bacteriana (Tris-HCl 50mM pH=8,0, EDTA 100nM, Glicerol 10% v/v, Triton x100 0,5% v/v, PMSF 1mM, DTT 1mM, NaCl 200mM, DNase I 100U/mL, MgCl<sub>2</sub> 10mM, RNase 25 ug/mL e Lisozima 200 ug/mL). Para a obtenção de extratos de isolados bacterianos disbióticos, as bactérias crescidas em meio LB por 24 horas a 37°C foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C e foram lavadas em solução de NaCl 0,9% p/v estéril. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores,

o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de solução de lise bacteriana. Após ressuspensão em solução de lise bacteriana, as células foram submetidas a 3 ciclos de sonicação (sonicador MSE Soniprep) de 30 segundos com intervalos de 1 minuto entre os ciclos. As amostras foram então incubadas no gelo por 30 minutos e em seguida foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e armazenado a -80°C para posterior utilização.

### **Quantificação de proteínas nos extratos bacterianos**

Para a quantificação de proteínas dos extratos bacterianos obtidos, utilizamos o reagente de Bradford da BIORAD. Primeiramente, foi confeccionada uma curva-padrão composta por uma solução de Albumina sérica bovina (BSA) que passou por diluições seriadas, sendo o ponto inicial da curva de concentração de 16 mg/mL, e o último ponto, de concentração de 0.125 mg/mL. Após diluição do reagente de Bradford na proporção de 1:5, conforme recomendado pelo fabricante, foram adicionados 200 µL do reagente por poço de uma placa de poliestireno de 96 poços de fundo chato. 2 µL de cada amostra foram adicionados aos poços, em duplicata. A absorbância a 595 nm foi obtida em espectrofotômetro e a concentração de proteínas foi obtida comparando-se com a curva padrão de Albumina sérica bovina submetidas ao mesmo procedimento.

### **Obtenção de extratos de proteínas do cólon**

Para obtenção do extrato de proteínas do cólon, foram adicionados uma solução contendo inibidor de proteases (0,1 mM *phenylmethanesulfonyl fluoride*, 0,1 mM *benzethonium chloride*, 10 mM EDTA e 20 KI de aprotinina A) e Tween 20 0,05% v/v, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução. as amostras então foram homogeneizadas com o auxílio do homogeneizador Power Gen 125 (Fischer Scientific Pennsylvania, USA). Posteriormente, foram centrifugadas a 3000 xg por 10 min a 4°C e os sobrenadantes recolhidos e aliquoteados em microtubos e armazenados a -20°C até a realização dos ensaios.

## ELISAs

### **Quantificação de IgG anti-microbiota fecal e anti-isolados disbióticos**

Após a quantificação de proteínas, 100  $\mu\text{L}$  de uma solução a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos extratos em PBS foram adicionadas aos poços de placa de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) e incubados por pelo menos 18 horas em câmara úmida a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 0,1% v/v. Em seguida, foi realizado o bloqueio com 200 $\mu\text{L}$  de BSA 1% p/v por poço, durante 1 hora à temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens. As amostras de soro e sobrenadante de fezes foram diluídas na proporção de 1:20 ou 1:2, respectivamente, em solução de BSA a 0,1% p/v em PBS, e 50  $\mu\text{L}$  foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após esse tempo e mais três ciclos de lavagens, foi realizado a incubação com o anticorpo secundário anti- IgG de camundongos biotilado produzidos em cabras (Southern biotech) na diluição de 1:5000 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS (100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ ), durante 1 hora a 37°C. Após mais três lavagens, foi feita a incubação com Estreptavidina conjugada à enzima peroxidase (R&D Systems). Para isso, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de Estreptavidina diluídos na proporção de 1:200 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem da placa e foi feito a reação, pela adição de 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$  do cromógeno L-o-fenilenodiamina (Sigma) na concentração de 4 mg/mL, contendo o substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6,6 mM) em tampão citrato (pH 5,0). Após a ocorrência da reação, a reação foi parada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1M e a absorbância lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492 nm (Status- labsystems, multiskan RC, niscience do Brasil).

### **Quantificação de citocinas e quimiocinas**

A quantificação das citocinas e quimiocinas IL-1 $\beta$ , CXCL1, TNF e IFN $\gamma$  no cólon foi realizada por meio do ensaio de ELISA, conforme recomendado pelo fabricante dos kits (R&D Systems). No primeiro dia do protocolo experimental, placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram sensibilizadas com cada um dos anticorpos de captura (50 $\mu\text{L}/\text{poço}$ ), diluídos em PBS, com posterior incubação por ao menos 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 0,1% v/v. O bloqueio foi feito com 200 $\mu\text{L}$  de BSA 1% p/v em PBS por poço durante 1 hora à temperatura ambiente seguido de 3 lavagens. As amostras processadas dos cólons foram

diluídas na proporção de 1:2 em solução de BSA a 0,1% p/v em PBS e 50 µL foram adicionadas a cada poço. Incubamos, novamente, por pelo menos 18 horas em câmara úmida a 4°C. No último dia do protocolo experimental, após novo ciclo de lavagens, foram adicionados 50µL do anticorpo de detecção em cada poço, diluídos em BSA 0,1% p/v em PBS, conforme recomendado pelo fabricante, com posterior incubação à temperatura ambiente sob agitação durante 2 horas. Após mais três lavagens com PBS-Tween 20 0,1% v/v, foi feita a incubação com Estreptavidina conjugada à enzima peroxidase (R&D Systems). Para isso, foi adicionado 50 µL de Estreptavidina diluída na proporção de 1:200 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS, à temperatura ambiente, por 20 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem da placa e foi feito a revelação, pela adição de 50µL/poço do cromógeno L-o-fenilenodiamina (Sigma) na concentração de 4 mg/mL, contendo o substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6,6 mM) em tampão citrato (pH 5,0). Após a ocorrência da reação, a reação foi parada pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M e a absorbância lida em leitor de ELISA com comprimento de onda de 492 nm (Status- labsystems, multiskan RC, niscience do Brasil).

### **Isolamento de leucócitos da lâmina própria intestinal**

Os cólons coletados dos animais WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> foram armazenados em um tubo Falcon contendo 25mL de Tampão 1 (HBSS 1x, HEPES 20 mM, coquetel de inibidor de proteases diluídos conforme recomendado pelo fabricante – Sigma-Aldrich - e gentamicina 40 µg/mL) para a lavagem. Foi agitado e descartado o tampão por 5 vezes, sempre mantendo o tecido em 25 mL de Tampão 1. O cólon foi então cortado em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura de microcirurgia. Após as lavagens, foi adicionado 20 mL de Tampão 2 (HBSS 1x, HEPES 20 mM e EDTA 2,5 mM) e incubados por 20 min a temperatura ambiente com agitação. Após incubação e centrifugação a 1800g por 5 min à temperatura ambiente, o sedimento foi lavado com 25 mL de Tampão 3 (RPMI 1640, glutamina 200 mM, soro fetal bovino 5% p/v, HEPES 20mM e gentamicina 40 µg/mL). Após nova centrifugação a 1800g por 5 min à temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspense em 25mL de Solução de Colagenase-DNAse (RPMI 1640, glutamina 200 mM, HEPES 20mM, gentamicina 40 µg/mL, colagenase D a 0,5 mg/mL e DNAse I a 20 µg/mL) e incubado por 1 h a 37°C sob agitação. Após a incubação, a suspensão foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e então filtrada em uma malha de 100 µm. Após nova centrifugação a 1800g por 5 min à temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspense em 10 mL de Tampão 3. As células foram contadas após coloração vital com azul de Tripán (0,4% p/v em PBS) com auxílio de uma

câmara de Neubauer e então diluídas para a concentração de  $5 \times 10^6$  células por mL em Tampão 3. As células obtidas foram utilizadas para a citometria de fluxo.

### **Marcação de leucócitos e citometria de fluxo para avaliar a expressão de iNOS**

Cerca de 100  $\mu$ L das suspensões de células foram distribuídas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo côncavo. Após centrifugação a 3000g por 10 minutos a 4°C e descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas e incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos com um mix de anticorpos contendo os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: anti- CD45 (conjugado a PerCP/Cy5.5), anti- F4/80 (conjugado a FITC), anti- CD11b (conjugado a APC/Cy7), anti- Ly6C (conjugado a PE/Cy7), anti- Ly6G (conjugado a V421) e anti- CD19 (conjugado a Alexa Fluor 647) (BioLegend). Depois da incubação, as amostras foram lavadas com 175 $\mu$ l de PBS contendo 0,5% p/v de BSA em PBS e centrifugadas a 3.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200  $\mu$ L de solução de fixação (formaldeído a 2% v/v em PBS) e incubado ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos. Após nova centrifugação a 3000g por 10 minutos a 4°C, os sedimentos foram ressuspensos em tampão de permeabilização (eBiosciences) e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após lavagem com tampão de permeabilização e nova lavagem, as células foram incubadas com anti-NOS2 murino conjugado a PE (BioLegend) em tampão de permeabilização, por 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão de permeabilização, seguida de lavagem com PBS, as células passaram pelo processo de fixação (incubação em solução de formaldeído a 2% v/v em PBS) por 20 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Após a incubação, as amostras foram novamente centrifugadas e, após descarte do sobrenadante, e ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro FACSCanto II (BD biosciences) e analisadas no software FlowJo (Tree Star Inc).

### 3.4 Análise estatística

Para as análises envolvendo a parte experimental do trabalho, foi utilizado o software GraphPad PRISM 8.0, desenvolvido pela GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA). Realizamos teste t de Student não pareado para comparação entre dois grupos, teste One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal ou pós-teste de Kruskal-Wallis para dados sem distribuição gaussiana (escore clínico). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão médio. O nível de significância adotado para todos os testes foi de  $P < 0,05$ .

Para as análises dos dados selecionados ao banco de dados IBDMDB utilizamos o IDE RStudio Desktop 2021.09.0+351. Para as análises de diversidade utilizamos a ferramenta phyloseq, na diversidade alfa focamos nos índices observados, de Shannon e de Simpson, com posterior análise de One way ANOVA e pós-teste de Tukey, sendo que o nível de significância adotado foi de  $P \leq 0,05$ . Para as análises do transcriptoma e abundância relativa taxonômica utilizamos o DESeq2. O nível de significância adotado para estas análises foi  $P \leq 0,05$  e  $\log_2FC \leq -1$  ou  $\geq 1$  pelo Wald *test*.

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterização da coorte selecionada do banco de dados e determinação de perfis sorológicos

Para realização das análises multi-ômicas selecionamos um banco de dados multi-ômicos de doenças intestinais inflamatórias (IBDMDB) de livre acesso para uso da comunidade. Este banco de dados foi montado após o acompanhamento de 132 indivíduos durante um ano. Como nosso objetivo era comparar os parâmetros sorológicos com os demais dados fizemos uma triagem nessa coorte do banco de dados e selecionamos apenas os indivíduos que cujos dados de sorologia foram coletados, sendo eles os marcadores sorológicos ANCA, anticorpos anti-OmpC e anticorpos anti-CBir1. Apenas 56 indivíduos apresentaram estes dados disponíveis. Dentre os selecionados, 27 eram diagnosticados com doença de Crohn (grupo DC), 13 com colite ulcerativa (grupo UC) e 16 sem doenças inflamatórias intestinais diagnosticadas (grupo sem DII). Os voluntários encaixados no grupo sem DII também apresentavam sintomas gastrointestinais, não podendo, portanto, serem

denominados como grupo saudável ou controle (tabela 1). Conforme detalhado na tabela 1, a coorte é composta por indivíduos de diferentes faixas etárias variando de 6 anos de idade, como mínimo, e 74 anos, como máximo. Estes pacientes foram triados de três localidades: Cincinnati, Massachusetts e Emory, nos EUA, sendo 42,3% do sexo feminino e 57,7% do sexo masculino.

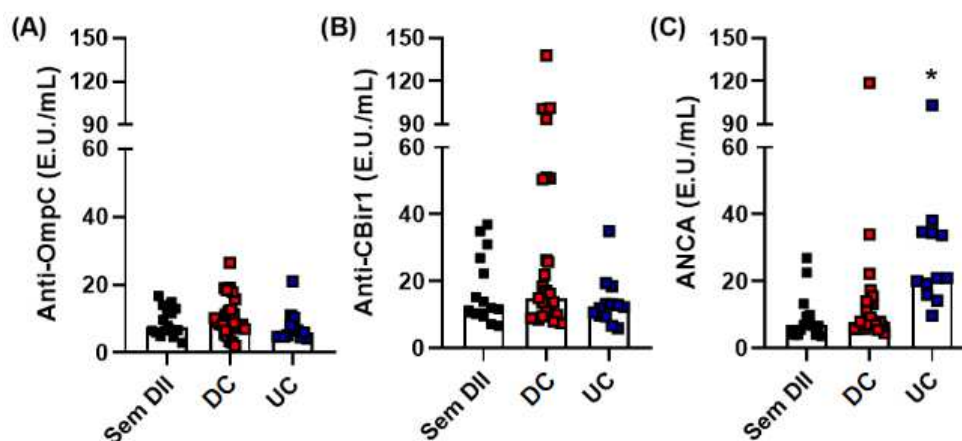
**Tabela 1. Divisão da coorte por diagnóstico, sexo, características físicas e local.**

		Cincinnati	Massachusetts	Emory	Total / Média geral
<b>Pacientes</b>		29	26	1	56
<b>Diagnóstico</b>	<b>Sem DII</b>	8 (27,6%)	8 (30,8%)	0	16 (28,6%)
	<b>DC</b>	15 (51,7%)	12 (46,2%)	0	27 (48,2%)
	<b>UC</b>	6 (20,7%)	6 (23,0%)	1 (100%)	13 (23,2%)
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	13 (44,8%)	10 (38,5%)	1 (100%)	24 (42,3%)
	<b>Masculino</b>	16 (55,2%)	16 (61,5%)	0	32 (57,7%)
<b>Características da coorte</b>	<b>Idade (anos)</b>	12,8 ± 2,9 (6-17)	31,3 ± 17,6 (6-74)	7	21,3 ± 15,3
	<b>Peso (kg)</b>	52,7 ± 20,9 (18-102)	64,5 ± 21,3 (18-104)	30,6	57,7 ± 21,8
	<b>Altura (cm)</b>	157,4 ± 16,1 (112-182)	166,4 ± 17,2 (114-193)	137	161,2 ± 17,2

\* Sem DII: Sem Doença Inflamatória Intestinal; DC: Doença de Crohn; UC: Colite Ulcerativa

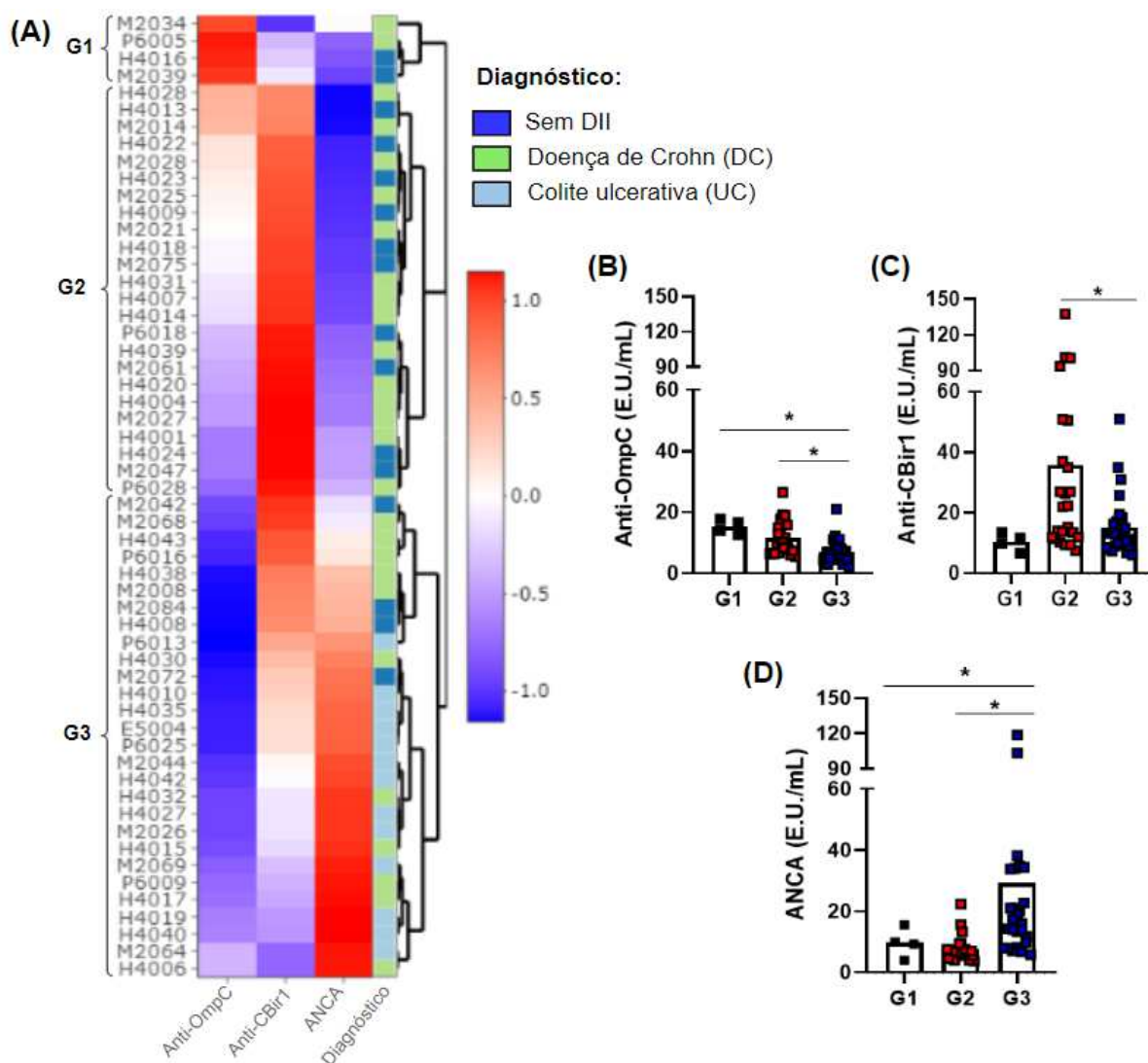
A primeira análise realizada com este conjunto de dados foi comparar cada um dos marcadores sorológicos entre os pacientes de acordo com o diagnóstico dos voluntários. Conforme detalhado na figura 6 A-B, não foram observadas diferenças significativas nos títulos de anti-OmpC ou anti-CBir1 entre os grupos estratificados de acordo com o seu diagnóstico. Apenas os títulos de ANCA mostraram-se significativamente aumentados no grupo diagnosticado com colite ulcerativa (Figura 6C). Diante deste resultado, não foi

possível traçar um fenótipo sorológico distintivo entre os voluntários separando-os de acordo com o seu diagnóstico. Desta forma, pensamos em uma nova maneira de agrupar a coorte, visto que nosso objetivo envolve avaliar se haveria associação entre o perfil sorológico destes com os demais parâmetros microbiológicos e transcricionais.



**Figura 6. Caracterização do perfil sorológico de cada grupo de pacientes de acordo com diagnóstico.** A quantificação dos marcadores sorológicos no soro dos pacientes foi realizada utilizando o método de ELISA, tendo sido quantificado o título de (A) Anti-OmpC, (B) Anti-CBir1 e (C) ANCA. E.U.: Unidades de Elisa. Sem DII: n=16, DC: n=27 e UC: n=13. \*P<0,05 vs Sem DII.

Para tentar determinar um fenótipo sorológico realizamos um novo agrupamento de acordo com o perfil sorológico dos pacientes. O primeiro passo foi construir um heatmap agrupando pacientes que apresentavam títulos semelhantes dos três marcadores sorológicos avaliados. Conforme ilustrado na figura 7A, este novo sistema de agrupamento possibilitou identificar três grupos. O grupo 1 (G1), englobando os pacientes que apresentavam maiores títulos de Anti-OmpC e menores títulos dos demais anticorpos, denominado de grupo anti-OmpC (Figura 7B); o grupo 2 (G2), que apresentou títulos mais altos de anti-CBir1, títulos variáveis de anti-OmpC e títulos reduzidos de ANCA, denominado como grupo anti-CBir1; e o grupo 3 (G3), que concentrou os pacientes com maiores títulos de ANCA, títulos reduzidos de anti-OmpC e títulos variáveis de anti-CBir1, denominados como grupo ANCA (Figura 7A-D).



**Figura 7. Novo agrupamento de pacientes a partir da determinação do fenótipo sorológico.**

O novo agrupamento foi realizado utilizando como parâmetro de separação os marcadores sorológicos dos pacientes (A) Heatmap contendo a estratificação dos pacientes quanto aos marcadores sorológicos e ao diagnóstico. Títulos de (B) Anti-OmpC, (C) Anti-CBir1 e (D) ANCA entre os pacientes de cada um dos 3 grupos obtidos após estratificação conforme os parâmetros sorológicos. E.U.: Unidades de Elisa. G1: grupo Anti-OmpC (n=4), G2: grupo Anti-CBir1 (n=24) e G3: grupo ANCA (n=28). Heatmap foi gerado através da correlação de Pearson. \*P<0,05.

Devido a nova forma de agrupamento que utilizamos, o grupo anti-OmpC incluiu apenas 4 pacientes, enquanto os grupos anti-CBir1 e ANCA apresentaram uma distribuição mais homogênea, sendo compostos por 24 e 28 pacientes respectivamente, conforme foi

detalhado na tabela 2. Em relação ao diagnóstico, apenas os pacientes diagnosticados com colite ulcerativa se mantiveram no mesmo grupo (ANCA), sendo que os pacientes com os demais diagnósticos, sem DII e doença de Crohn, se distribuíram pelos três agrupamentos sorológicos.

**Tabela 2. Novo agrupamento da coorte de acordo com perfil sorológico**

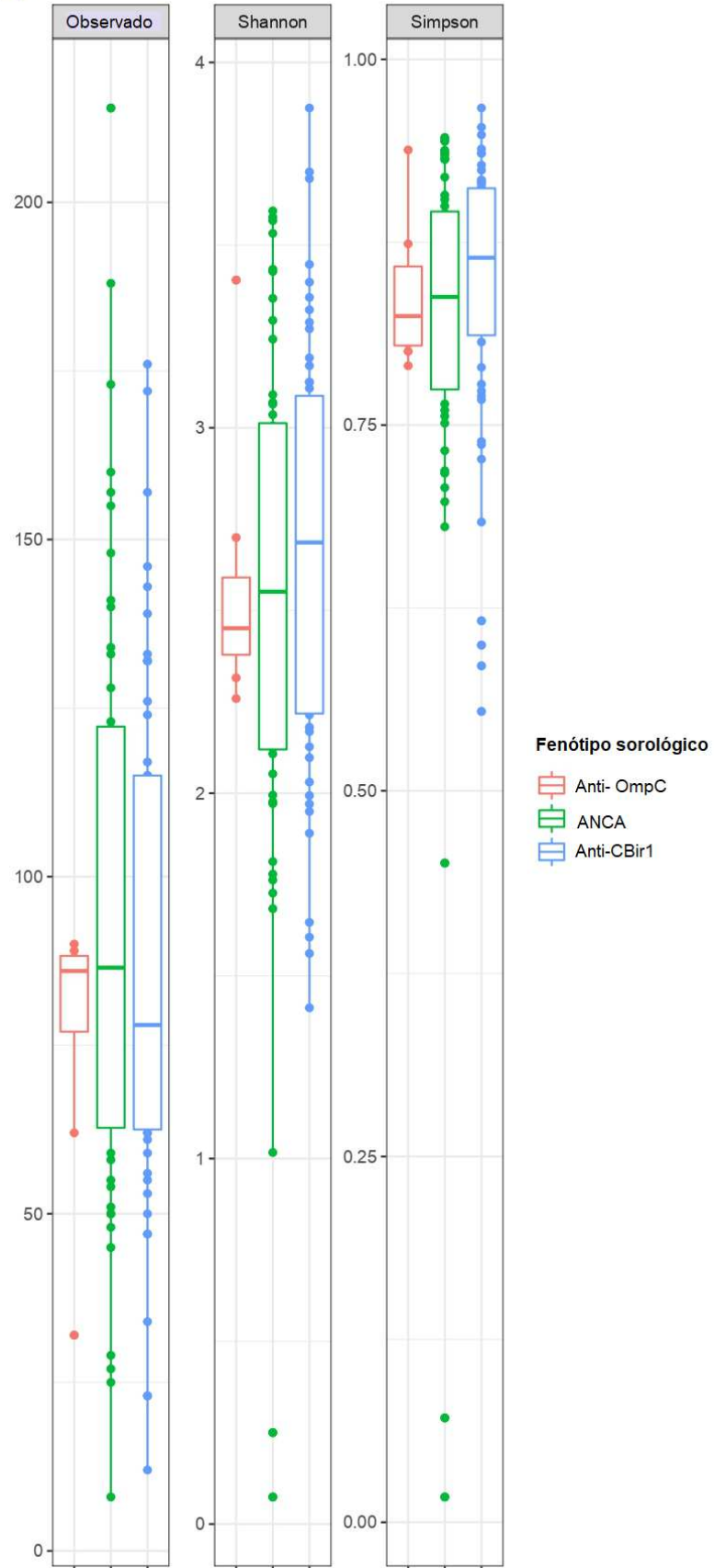
		Grupos			Total / Média geral
		Anti-OmpC (G1)	Anti-CBir (G2)	ANCA (G3)	
	<b>Pacientes</b>	4 (7,1%)	24 (42,9%)	28 (50%)	56 (100%)
<b>Diagnóstico</b>	<b>Sem DII</b>	2 (50,0%)	10 (41,7%)	4 (14,3%)	16 (28,6%)
	<b>DC</b>	2(50,0%)	14 (58,3%)	11 (39,3)	27 (48,2%)
	<b>UC</b>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	13 (46,4%)	13 (23,2%)
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	3 (75%)	10 (41,7%)	11 (39,3%)	24 (42,3%)
	<b>Masculino</b>	1 (25%)	14 (58,3%)	17 (60,7%)	32 (57,7%)
<b>Características da coorte</b>	<b>Idade (anos)</b>	20,7 ± 13,9 (10-40)	22,1 ± 16,8 (6-61)	20,8 ± 14,6 (6-74)	21,3 ± 15,3
	<b>Peso (kg)</b>	59,8 ± 38,5 (24-104)	54,1 ± 20,8 (18-93)	60,6 ± 20,4 (18-101)	57,7 ± 21,8
	<b>Altura (cm)</b>	150,3 ± 12,3 (134-160)	159,8 ± 18,8 (112-188)	164,1 ± 15,8 (114-193)	161,2 ± 17,2
<b>Local dos pacientes</b>	<b>Cincinnati</b>	1	14	14	29
	<b>Massachusetts</b>	3	10	13	26
	<b>Emory</b>	0	0	1	1

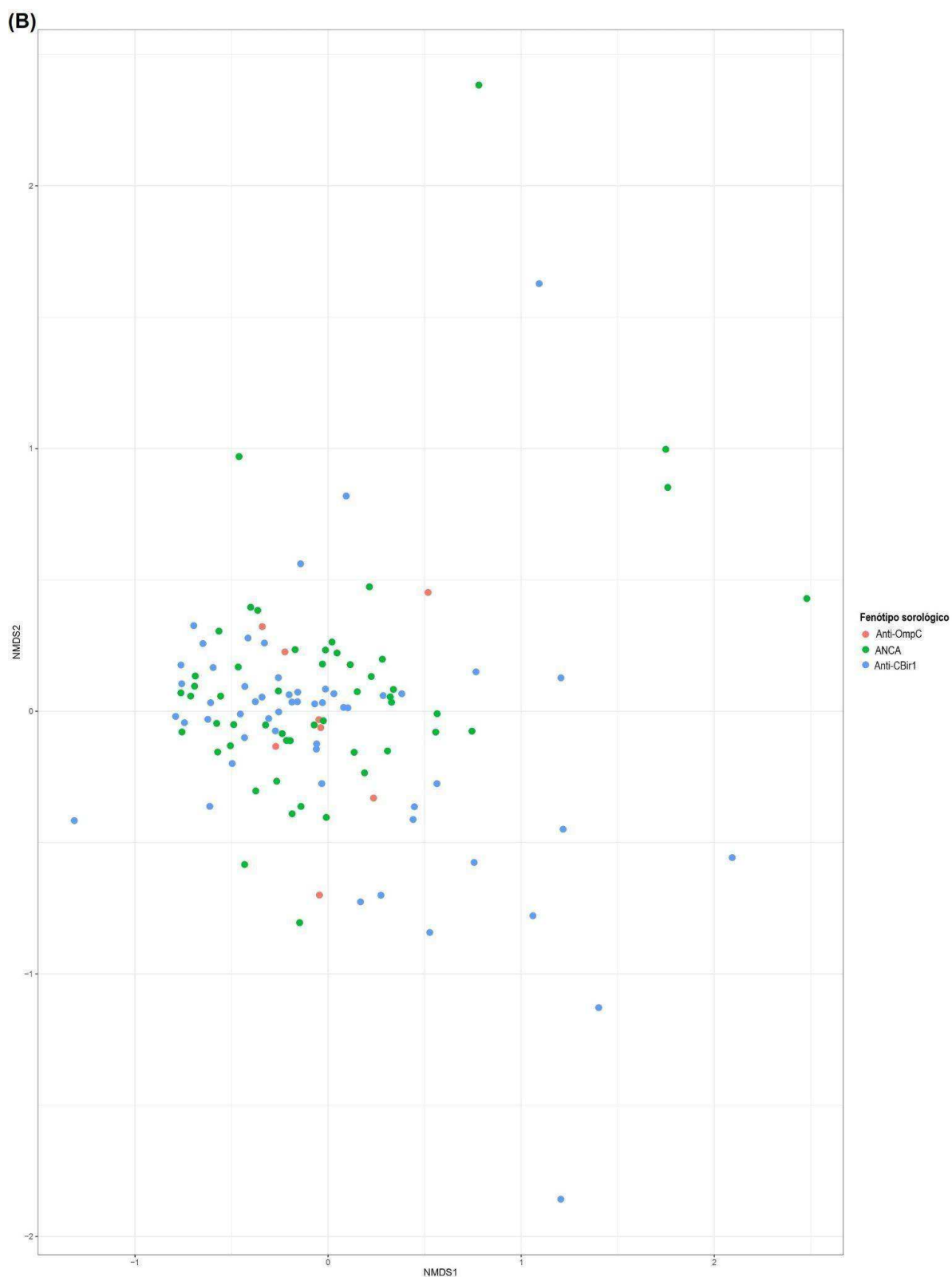
\* Sem DII: Sem Doença Inflamatória Intestinal; DC: Doença de Crohn; UC: Colite Ulcerativa

## **4.2 Comparação entre o fenótipo sorológico e a composição da microbiota dos hospedeiros**

Após identificar os fenótipos sorológicos focamos em determinar a associação entre o perfil sorológico e a composição da microbiota. O primeiro passo foi avaliar se existiam diferenças em relação à diversidade da microbiota dos pacientes de cada um dos fenótipos sorológicos. Para isso utilizando os dados de sorologia e o conjunto de dados de sequenciamento da região 16S do DNA extraído das amostras de fezes obtidas da nossa coorte analisamos a alfa diversidade dos grupos utilizando o índice observado, de Shannon e de Simpson e beta diversidade utilizando análise de coordenadas principais (PCoA). Conforme demonstrado na figura 8A, nenhum dos índices avaliados mostraram diferenças em relação a diversidade da microbiota de cada um dos fenótipos sorológicos. Este dado mostra que a diversidade da microbiota não é diferente entre os diferentes fenótipos sorológicos obtidos. Também não observamos diferenças na diversidade beta analisada dos grupos, mostrando que não há também estratificação da estrutura da microbiota entre os pacientes de acordo com o fenótipo sorológico (figura 8B).

(A)



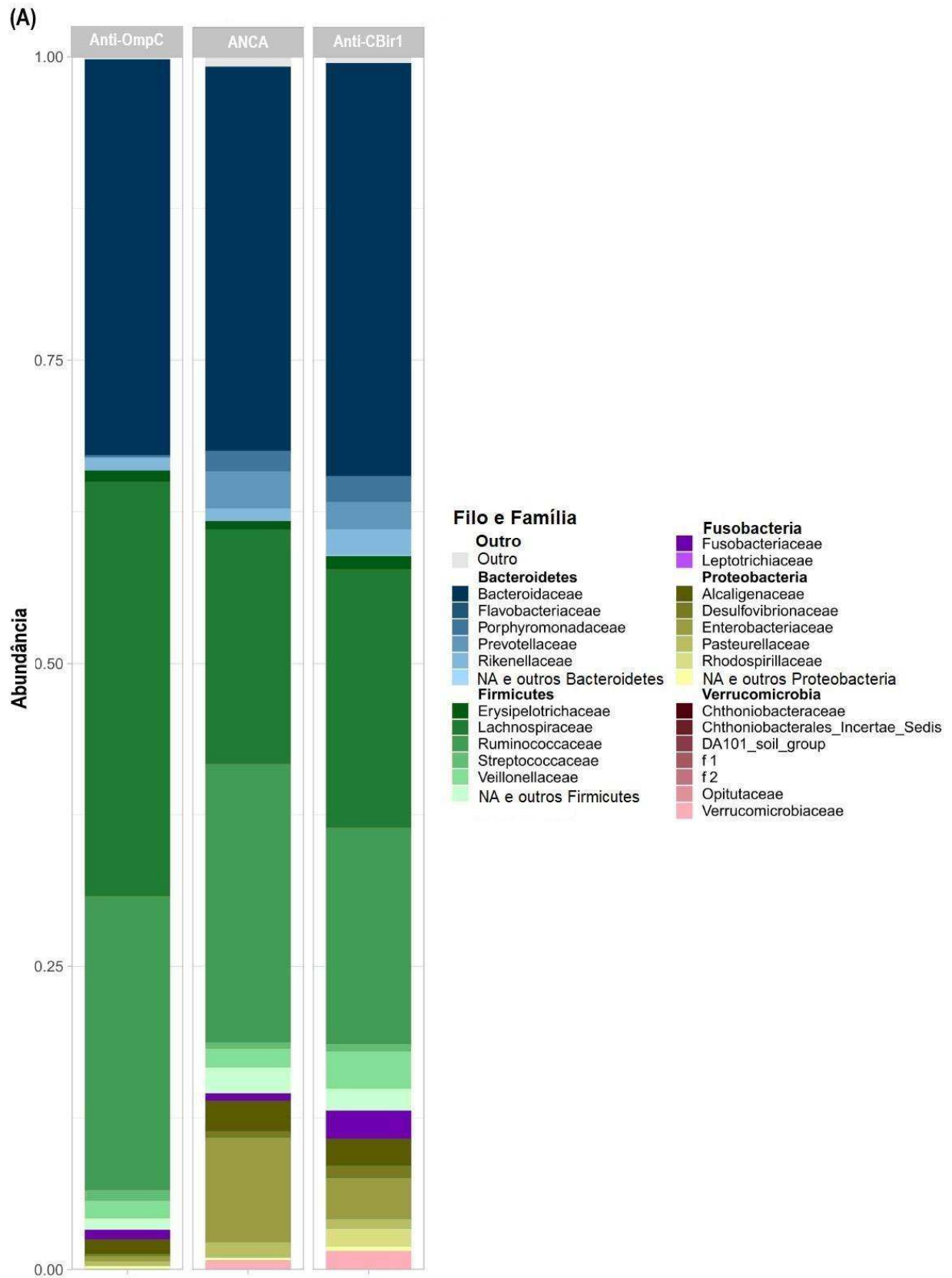


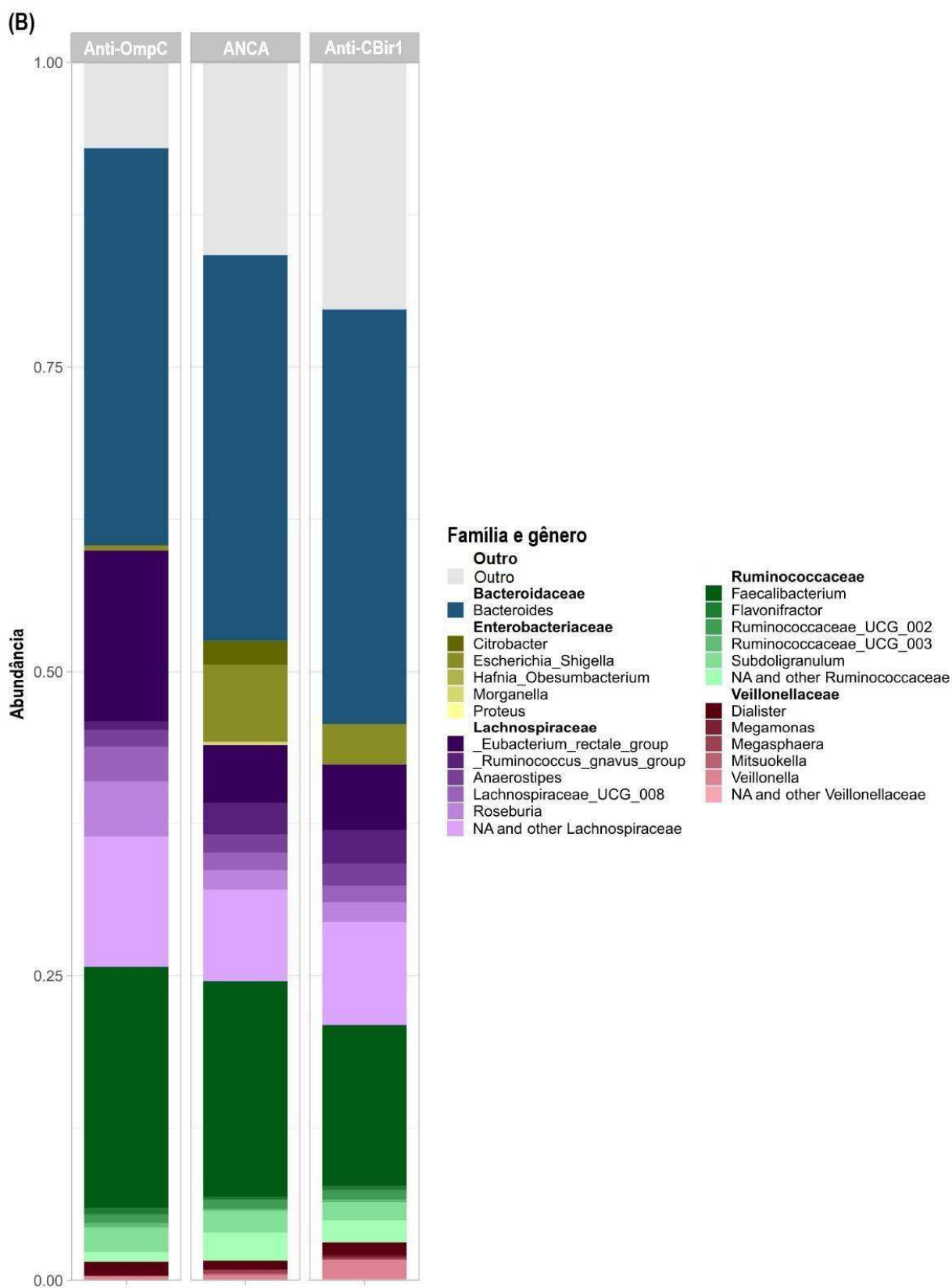
**Figura 8. Diversidade alfa e beta da microbiota entre os agrupamentos de acordo com fenótipo sorológico.** Utilizando os dados de sequenciamento da região 16S rDNA V4 amplificada após a extração do DNA fecal de amostras de fezes de cada grupo de pacientes

realizamos as análises de (A) alfa diversidade utilizando os índices observado, índice de Shannon e de Simpson usando o pacote *phyloseq*, com posterior análise de One way ANOVA com pós-teste de Tukey. (B) Beta diversidade, utilizando análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando a dissimilaridade (ou distância) das amostras entre si. Grupo Anti-OmpC n=4, grupo Anti-CBir1 n=24 e grupo ANCA n=28.

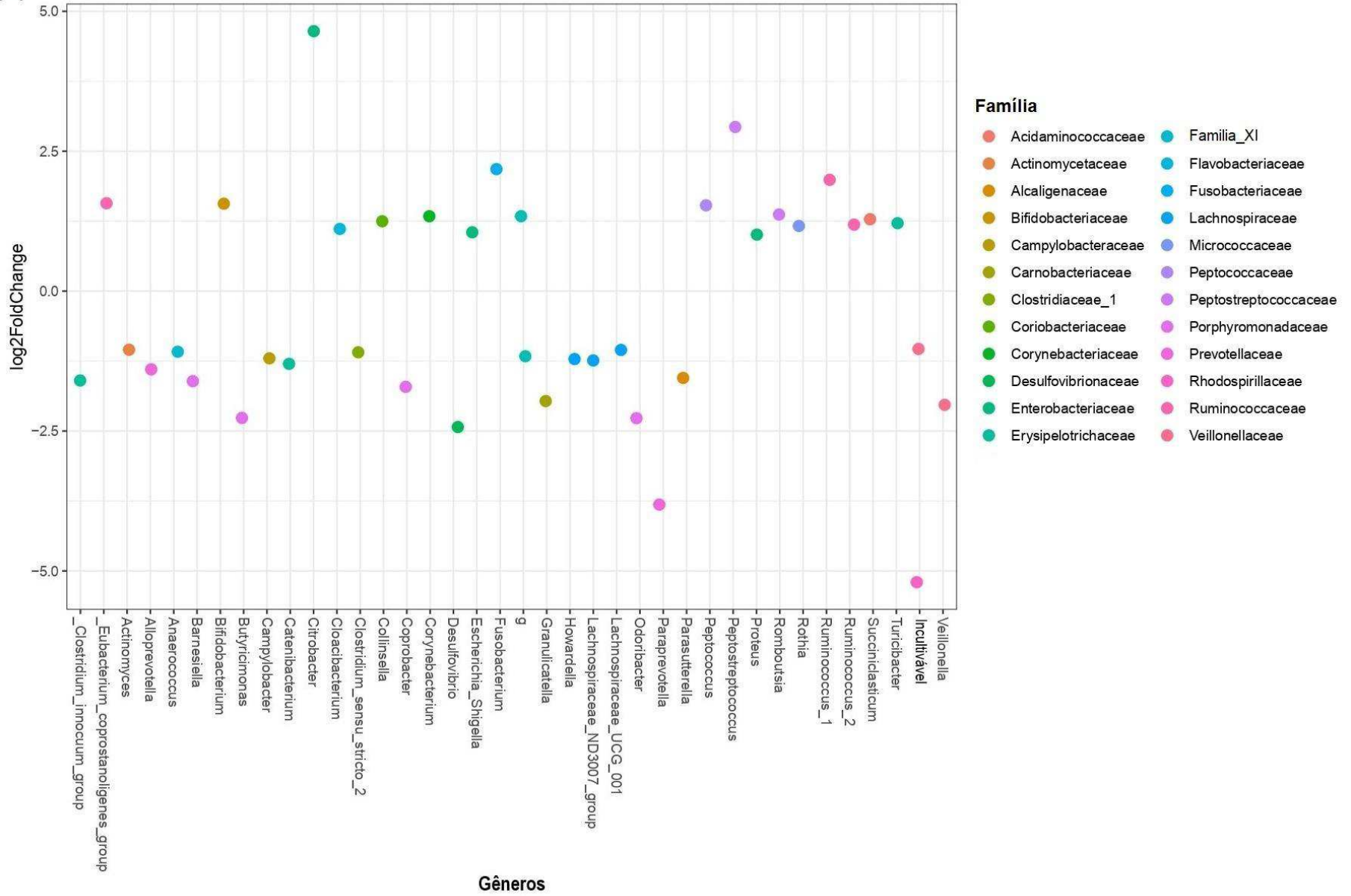
Contudo, ao avaliar a abundância de diferentes filos, famílias e gêneros bacterianos na microbiota fecal de cada um dos pacientes, observamos que alguns táxons estavam presentes em maior proporção e outros em menor proporção em pacientes de determinados grupos sorológicos (figura 9A-B). Houve uma redução relativa na família Lachnospiraceae, no filo Firmicutes, e aumentos relativos nas famílias Prevotellaceae e Rickenellaceae, do filo Bacteroidetes, nas famílias Alcaligenaceae e Enterobacteriaceae, do filo Proteobacteria, e na família Verrucomicrobiaceae, do filo Verrucomicrobia, nos grupos ANCA e anti-CBir1 em relação ao grupo anti-OmpC. Também observamos quedas expressivas dos gêneros *Eubacterium* e *Faecalibacterium*, das famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae, respectivamente. Além disso, é possível observar um aumento da abundância relativa dos gêneros *Citrobacter* e *Escherichia-Shigella* nos mesmos grupos. Devido ao número reduzido de pacientes no grupo anti-OmpC, o que reduziria o poder das análises estatísticas realizadas, as demais análises comparativas foram realizadas apenas entre os grupos ANCA e anti-CBir1.

Conforme ilustrado na figura 9C, quando comparamos o grupo ANCA com o grupo anti-CBir1 observamos que os pacientes com elevados títulos de ANCA apresentaram algumas diferenças pontuais em sua microbiota intestinal. Este grupo apresentou 18 táxons aumentados e 22 táxons reduzidos quando analisamos o conteúdo relativo das bactérias presentes na microbiota dos pacientes. As famílias com maior número de táxons diminuídos foram Lachnospiraceae e Porphyromonadaceae (gêneros *Odoribacter* e *Butyricimonas*), enquanto o maior número de táxons aumentados pertencia à família Enterobacteriaceae e Ruminococcaceae. Os táxons aumentados da família Enterobacteriaceae eram pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Escherichia* e *Proteus*, enquanto aqueles classificados como Ruminococcaceae pertenciam aos gêneros *Ruminococcus* e *Ruminoclostridium*.





(c)



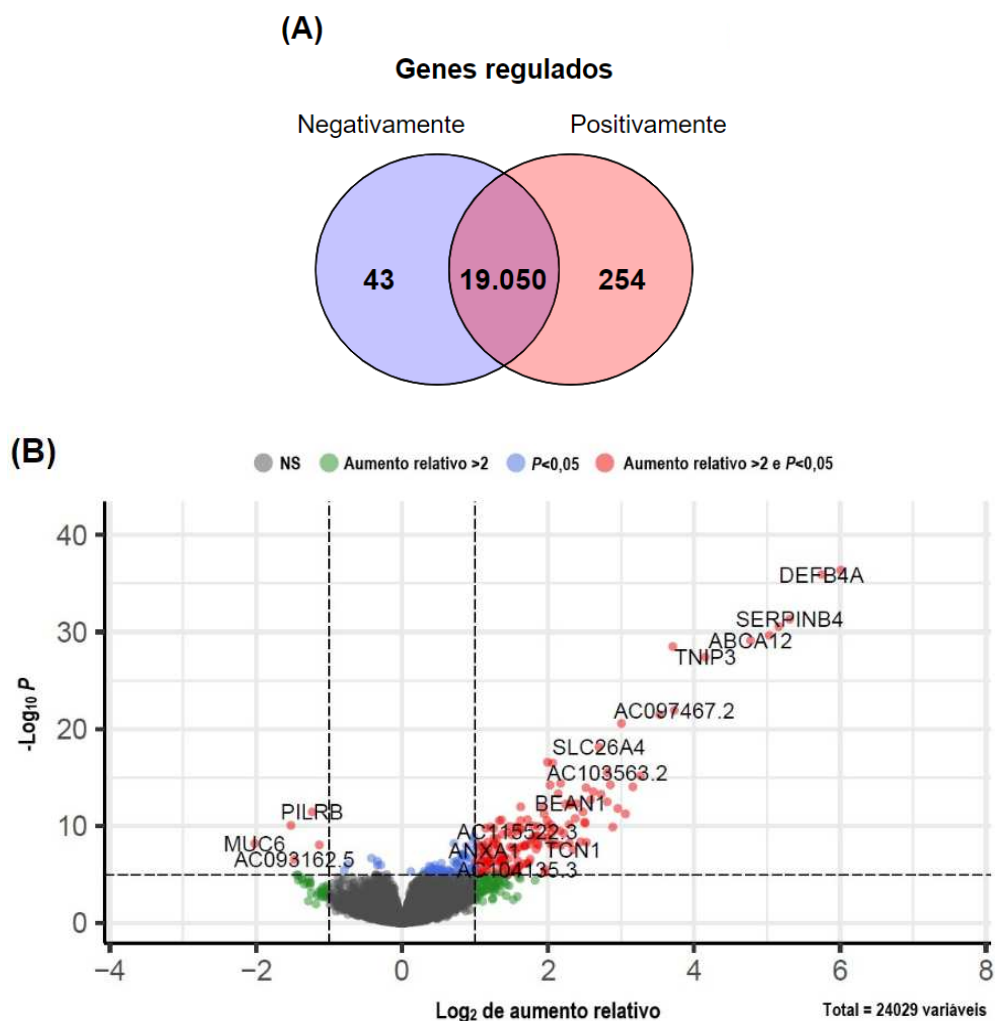
**Figura 9. Composição da microbiota dos pacientes agrupados de acordo com fenótipo sorológico.** (A) Gráfico de barras mostrando a abundância relativa média dos diferentes filos e famílias presentes na microbiota intestinal de cada um dos três grupos sorológicos. (B) Gráfico de barras mostrando a abundância relativa média das diferentes famílias e gêneros presentes na microbiota intestinal de cada um dos três grupos sorológicos. E (C) Dot Plot de táxons que apresentam aumento ou redução de abundância relativa ao se comparar o grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1. Gráficos gerados através do DEseq2. Os parâmetros adotados para filtragem das diferenças foram de acordo com os valores de  $P \leq 0,05$  e  $\log_2FC \leq -1$  ou  $\geq 1$  pelo Wald test. Grupo Anti-OmpC n=4, grupo Anti-CBir1 n=24 e grupo ANCA n=28.

Este conjunto de dados sugere que os pacientes agrupados quanto ao perfil sorológico dos pacientes apresentam diferenças discretas na composição da microbiota intestinal, sugerindo uma relação entre a resposta de IgG e a microbiota intestinal, em que pacientes com maiores títulos de ANCA apresentam aumento de bactérias anaeróbias facultativas da família Enterobacteriaceae, por exemplo.

#### 4.3 Comparação entre o fenótipo sorológico e a expressão gênica

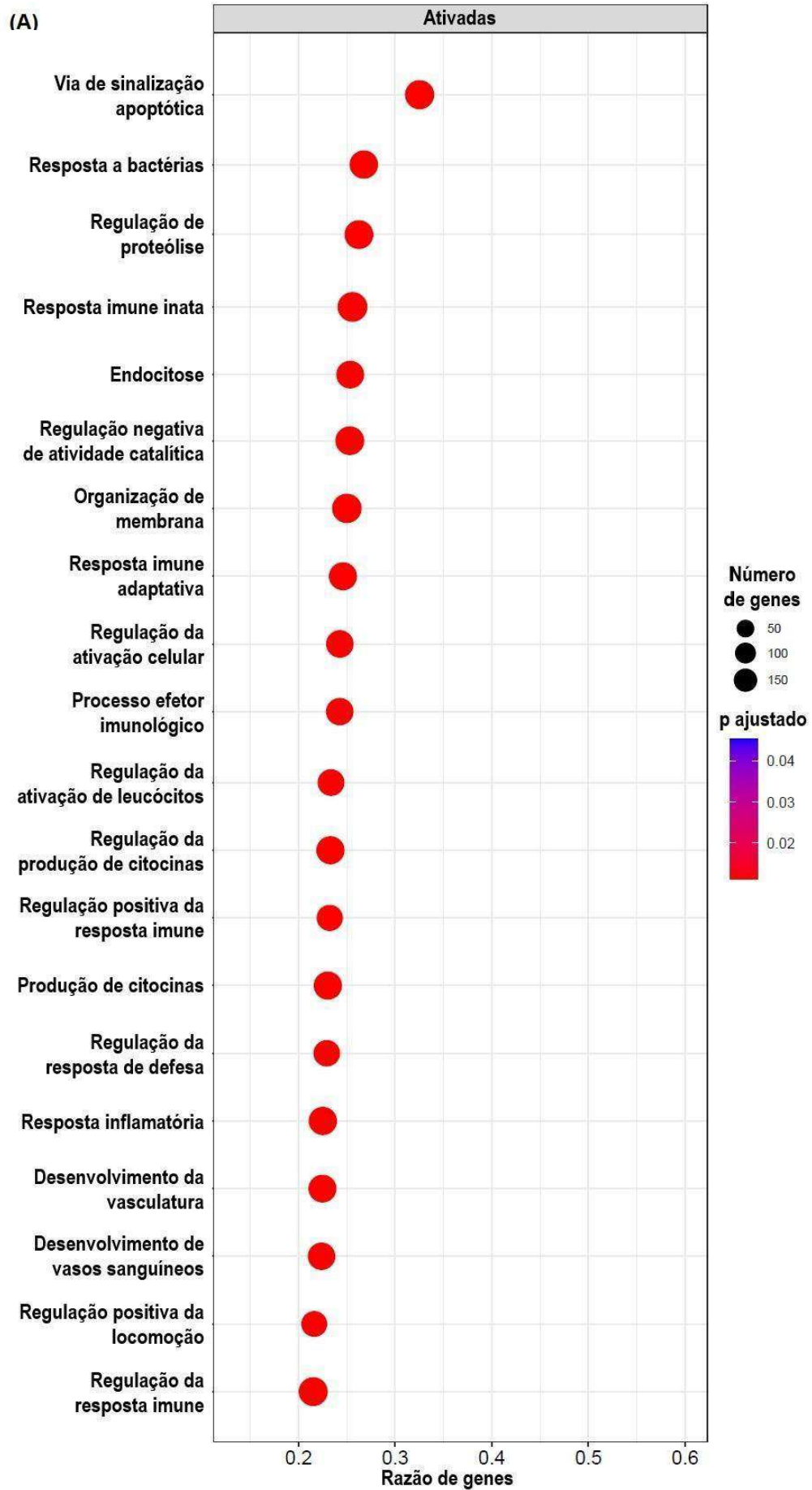
Após a identificação das diferenças de composição da microbiota intestinal em pacientes com diferentes perfis sorológicos resolvemos avaliar se havia diferenças na expressão gênica desses pacientes. Para isso utilizando os dados transcricionais do hospedeiro realizamos análises acerca da regulação gênica dos pacientes para identificar quais conjuntos de genes estavam sendo regulados positiva ou negativamente. Quando comparamos os grupos anti-CBir1 e ANCA observamos que havia algumas diferenças relevantes entre estes dois grupos. Conforme demonstrado na figura 10A, foram avaliados um total de 24.029 genes nos quais haviam mais genes regulados positivamente do que negativamente no grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1. Quando os filtros relativos a aumento relativo e diferença estatística foram utilizados ( $p \leq 0,05$  e  $\log_2FC \leq -1$  ou  $\geq 1$ ), chegou-se ao número de 254 genes regulados positivamente. Entre eles podemos ressaltar diversos genes envolvidos na resposta inflamatória como *NOS2*, *CXCL1*, *IL1B*, *IL17A*, *IL13*, e também genes relacionados a imunoglobulinas, incluindo os genes *IGHG1* e *IGHG3*. Em relação aos genes regulados negativamente, usando os mesmos critérios anteriores, chegamos ao número de 43 genes com

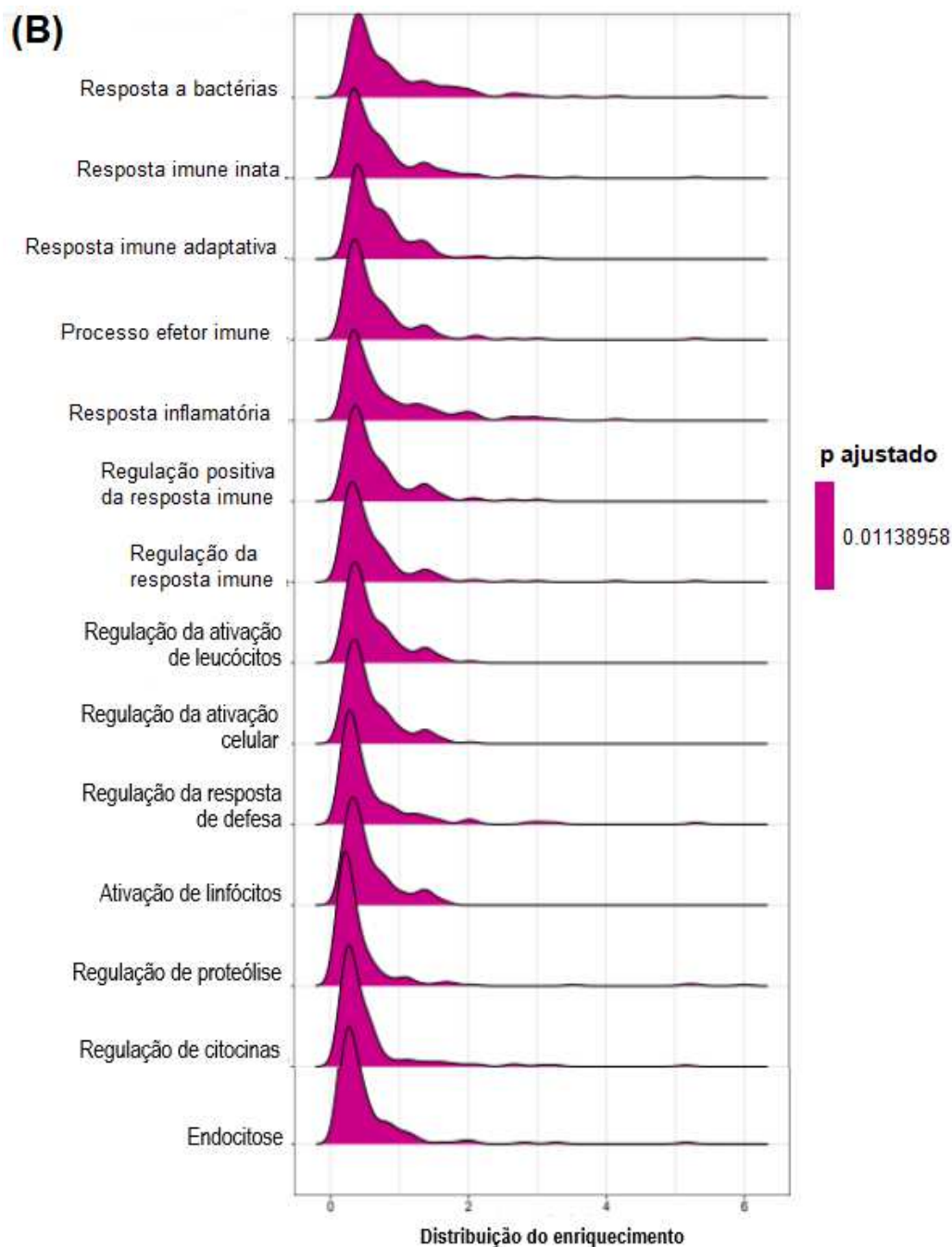
expressão suprimida no grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1. Dentre esses genes, podemos ressaltar genes envolvidos na modulação da composição da camada protetora de muco, como o gene *MUC6*, além de alguns genes envolvidos no recrutamento de leucócitos e regulação do sistema imune como *CCL1*, *PILRB*, *MSTIL*, e diversos genes relacionados ao sistema neural e transporte de íons e sais biliares, como *OR8D1*, *CALN1*, *ATP12A* e *ABCB11*.



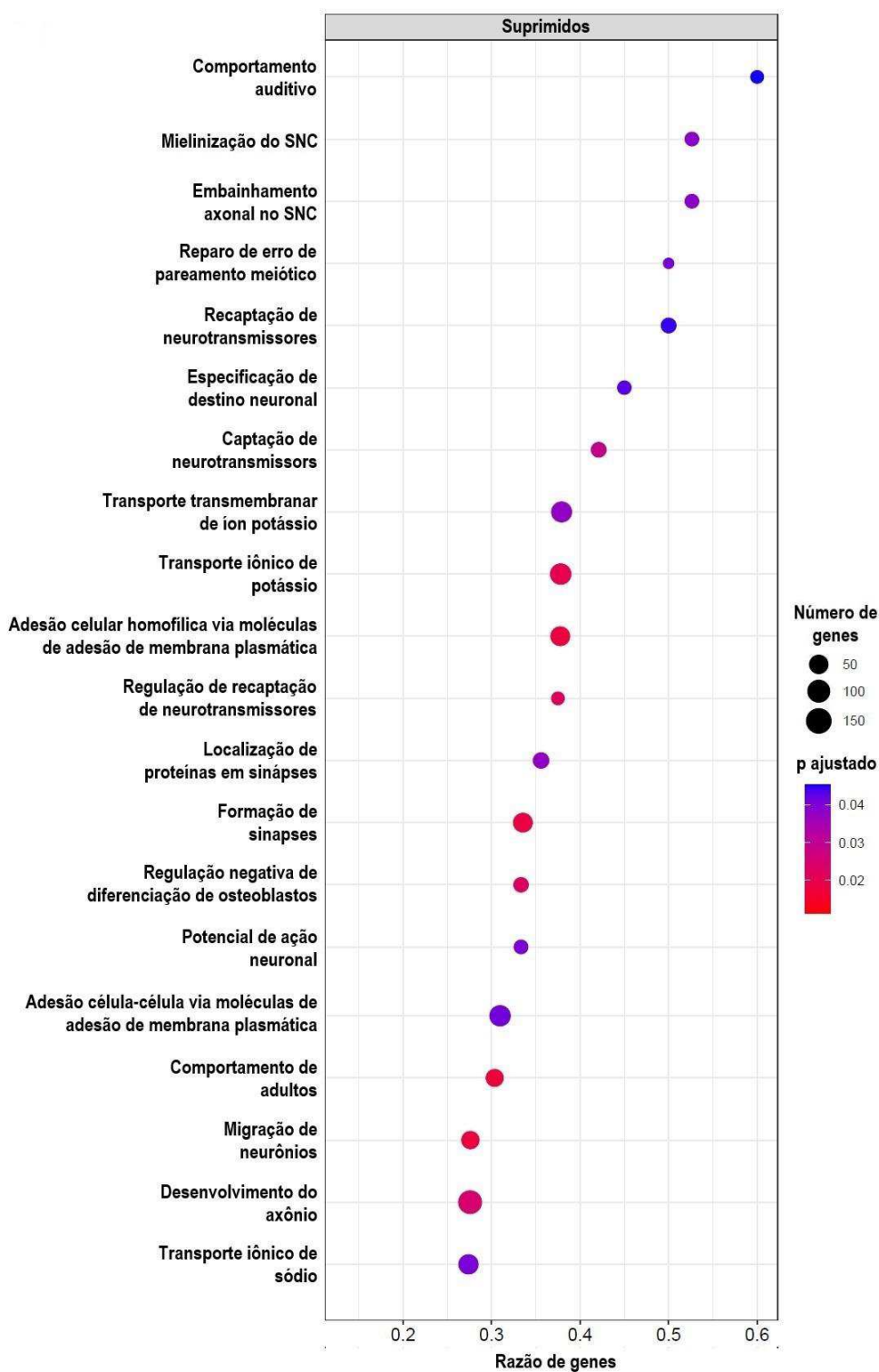
**Figura 10. Genes diferencialmente expressos entre pacientes do grupo anti-CBir1 e pacientes do grupo ANCA.** (A) Diagrama de Venn com número de genes regulados positiva e negativamente nos transcriptomas de pacientes do grupo ANCA em relação ao de pacientes do grupo anti-CBir1. (B) Volcano Plot mostrando a os genes regulados positivamente (à direita) e negativamente (à esquerda) no grupo com altos títulos de ANCA quando comparado ao grupo com altos títulos de anti-CBir. Gráfico gerado através do DEseq2. Os parâmetros adotados para filtragem das diferenças foram de acordo com os valores de  $P \leq 0,05$  e  $\log_2FC \leq -1$  ou  $\geq 1$  pelo Wald test.

Diante da observação das diferenças presentes na expressão gênica dos pacientes dos dois grupos sorológicos, buscamos avaliar se os genes com expressão acentuados ou suprimidos compunham alguma via biológica funcional, utilizando uma análise de enriquecimento baseado na ontologia gênica, usando os parâmetros estabelecidos pelo banco de dados “*Gene Ontology*”. Conforme ilustrado na figura 11 A e B, as principais vias ativadas (figura 11A) e enriquecidas (figura 11B) estão relacionadas à sinalização apoptótica, remodelamento de membrana e endocitose, resposta a bactérias e as vias envolvidas na resposta inflamatória e imune inata e adaptativa. Na sua maioria, havia mais de 100 genes cuja expressão foi acentuada no grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1 catalogados em cada uma dessas vias ontológicas, compondo entre 20 e 30% dos genes da via. Quanto a distribuição de enriquecimento, havia um aumento relativo mais expressivo em um maior número de genes das vias associadas à resposta a bactérias, resposta imune inata, resposta imune adaptativa, processos efetores imunes e resposta inflamatória, entre outras vias, quando comparamos o transcriptoma de pacientes do grupo ANCA com pacientes do grupo anti-CBir1. Em relação aos genes com expressão reduzida no grupo ANCA em relação a anti-CBir1, destacaram-se principalmente genes catalogados como envolvidos em mielinização neuronal, vias de captação de neurotransmissores e vias de transporte iônico (figura 12). Em geral, o número de genes diferencialmente expressos pertencentes a essas categorias ficou abaixo de 100, porém compreendendo entre 25 até 60% dos genes pertencentes à via.





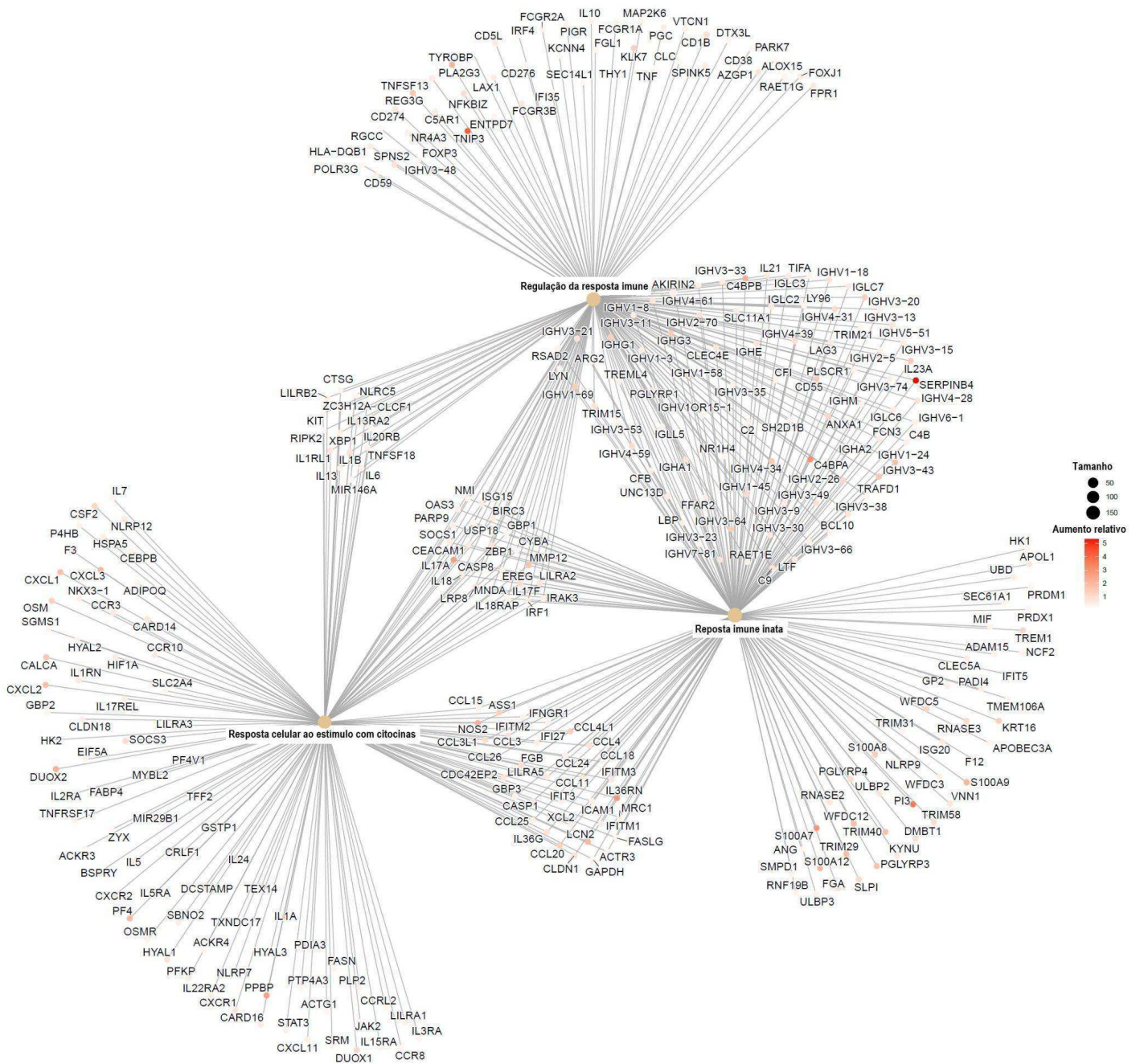
**Figura 11. Vias transcricionais ativadas e enriquecidas em pacientes do grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1.** (A) Dot plot de vias ativadas e (B) Rigde plot de vias enriquecidas no grupo com maiores títulos de ANCA em comparação com grupo Anti-CBir1. Gráfico gerado através do DEseq2. Os parâmetros adotados foram de acordo com os valores de P corrigidos sendo  $P \leq 0,05$  e  $\log_2FC \leq -1$  ou  $\geq 1$  pelo Wald test.



**Figura 12. Vias transcricionais suprimidas em pacientes do grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1.** Dot plot de vias suprimidas. Gráfico gerado através do DEseq2. Os parâmetros adotados foram de acordo com os valores de P corrigidos sendo  $P \leq 0,05$  e  $\log_2FC \leq -1$  ou  $\geq 1$  pelo Wald test.

A figura 13 ilustra um gráfico de redes onde podemos observar que diversos dos genes cuja expressão foi alterado em pacientes do grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1 são comuns a duas ou três vias biológicas funcionais, formando, portanto, conexões entre essas vias. A primeira das vias funcionais engloba genes envolvidos na regulação da resposta imune, como genes relacionados aos receptores de IgG de ativação (*FCGR2A* e *FCGR3B*). Outra via enriquecida demonstrada é via de resposta imune inata, que se conecta à via de regulação da resposta imune por meio de diversos genes, incluindo genes que expressam cadeias pesadas de Imunoglobulinas (*IGHE*, *IGHM*, *IGHG1-3*), proteínas do sistema complemento (*C9*, *C2*, *CD55*) e algumas interleucinas (*IL21*, *IL23A*). A última via da rede envolve a resposta celular ao estímulo de citocinas e quimiocinas. Nesta seção encontram-se vários genes que já foram citados anteriormente, dentre eles *CXCL1*, *CXCL3*, *PPBP*, *IL5*, *IL1A*. Parte dos genes com expressão alterada pertencentes a essa via estão também incluídos na via da resposta imune inata, incluindo genes como *CASP1*, *LCN2* e *NOS2*. Por fim, alguns dos genes diferencialmente expressos nos pacientes ANCA pertencem às três vias, entre eles os genes *IL17A*, *IL18* e *CYBA*.

Este conjunto de dados sugerem que os pacientes pertencentes ao grupo ANCA apresentam alterações expressivas na resposta transcricional, com aumento expressivo da transcrição de genes envolvidos em vias associadas à resposta inflamatória, funções imune efetoras, incluindo aquelas envolvidas na resposta a bactérias, o que pode justificar as diferenças encontradas na composição da microbiota deste grupo.



**Figura 13. Comunicação entre vias transcricionais enriquecidas em pacientes do grupo ANCA em relação ao grupo anti-CBir1.** Gráfico de rede ilustrando as três principais vias funcionais cujos genes tiveram expressão alterada em pacientes do grupo ANCA em relação a pacientes do grupo anti-CBir1. As vias são: regulação da resposta imune, resposta inata e resposta celular ao estímulo com citocinas. Gráfico gerado através do DEseq2. Os parâmetros

adotados para filtragem foram de acordo com os valores de  $P \leq 0,05$  e  $\log_2FC \leq -1$  ou  $\geq 1$  pelo Wald test.

#### 4.4 Caracterização do repertório de IgG anti-microbiota em animais WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>:

Após observar os resultados obtidos da análise dos dados multi-ômicos e concluir que diferenças sorológicas estão associadas tanto a diferenças microbiológicas quanto transcricionais, hipotetizamos que a resposta de IgG à microbiota poderia impactar na composição microbiana durante DII por modular a produção de mediadores inflamatórios e antimicrobianos. Buscamos testar essa hipótese em um modelo experimental murino. Conforme descrito por Brito e colaboradores, 2022, animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentam títulos de IgG anti-microbiota fecal diferentes dos animais selvagens. Dessa forma, testamos essa hipótese comparando animais selvagens e animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos ao modelo de colite ulcerativa.

Inicialmente, buscamos caracterizar o repertório de IgG dos dois grupos de animais à microbiota fecal pós-indução da colite e a isolados obtidos das fezes e de tecidos de animais submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por DSS. Para isso, identificamos os isolados disbióticos depositados previamente no biobanco do LIMHO. Estes isolados foram obtidos de amostras de fezes e do fígado de camundongos selvagens, *Mu*<sup>-/-</sup> ou *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> que passaram ou não pela exposição ao DSS. Estas amostras foram diluídas em solução de NaCl 0,9% p/v estéril e cultivadas nos meios sólidos seletivos de MacConkey. Após a obtenção de colônias isoladas, realizamos a identificação presuntiva através da coloração de gram e testes bioquímicos utilizando os meios indicadores de Rugai e Pessoa. Conforme detalhado na tabela 3, a maioria dos isolados apresentaram características presuntivas de *Escherichia coli*, incluindo as que foram recuperadas dos fígados dos camundongos nocautes submetidos ao modelo de colite ulcerativa. Julgamos como *E. coli* bactérias que apresentaram o seguinte padrão bioquímico: Fermentação da glicose positiva; produção de gás positiva; produção de sulfeto de hidrogênio negativa; hidrólise da uréia negativa; fermentação da sacarose positiva ou variável; descarboxilação da lisina positiva; desaminação do aminoácido L-triptofano negativa; motilidade positiva e reação de indol positiva.

**Tabela 3. Caracterização fenotípica dos isolados de enterobactérias por testes bioquímicos**

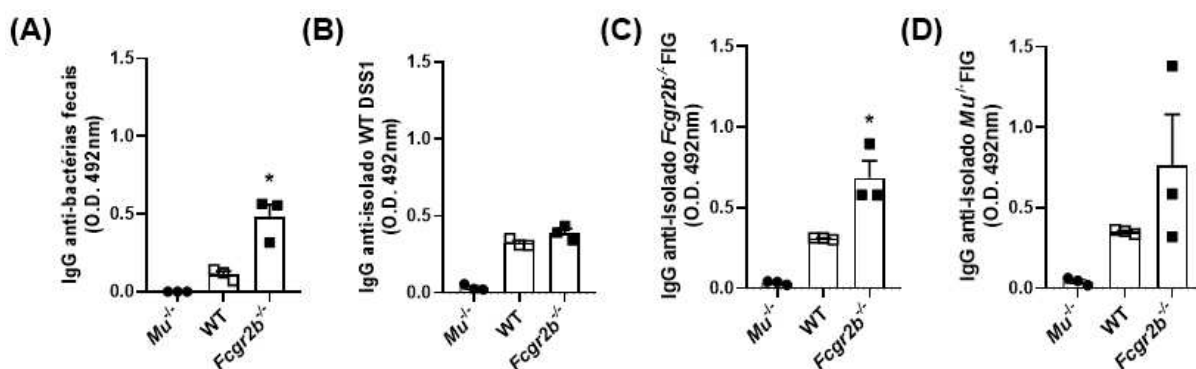
Amostra	GLI	GÁS	H <sub>2</sub> S	URE	SAC	LIS	LTD	MOT	IND	Identificação presuntiva
WT DSS1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
WT DSS2	+	+	-	-	+	-	-	+	-	<i>Enterobacter spp.</i>
<i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> H2O	+	+	-	-	+/-	+/-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> DSS1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> DSS2	+	+	-	-	+/-	+/-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> DSS3	+	+	-	-	+/-	+/-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> DSS4	+	+	-	-	+/-	+/-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Fcgr2b</i> <sup>-/-</sup> FIG	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Mu</i> <sup>-/-</sup> DSS1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Mu</i> <sup>-/-</sup> FIG	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>

\* (+) positivo; (-) negativo; (+/-) variável

Fermentação da glicose (GLI); produção de gás (GÁS); produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S); hidrólise da uréia (URE); fermentação da sacarose (SAC); descarboxilação da lisina (LIS); desaminação do aminoácido L-triptofano (LTD); motilidade (MOT) e reação de indol (IND).

Com os isolados devidamente identificados realizamos a extração de antígenos destes isolados disbióticos e de bactérias fecais de animais selvagens, *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> e *Mu*<sup>-/-</sup> para realização de um ELISA para detecção IgG no soro. Realizamos a quantificação de IgG circulantes anti-bactérias fecais reativas aos antígenos obtidos da respectiva microbiota fecal de cada genótipo. Em contrapartida, foi quantificada a presença de IgG circulante reativa aos extratos de todos os isolados, independentemente da origem dos mesmos. Conforme ilustrado na figura 14A-D, os animais *Mu*<sup>-/-</sup> não apresentaram IgG anti-bactérias fecais, nem a nenhum dos isolados testados, como esperado. Já os animais selvagens e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentaram IgG reativa a todos os extratos bacterianos testados. Porém, os animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentaram maiores títulos de IgG anti-bactérias fecais e anti-isolados originados de animais do seu mesmo genótipo, quando comparado a animais WT. Estes dados sugerem que animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentam maiores títulos de IgG reativas a bactérias da sua própria microbiota.

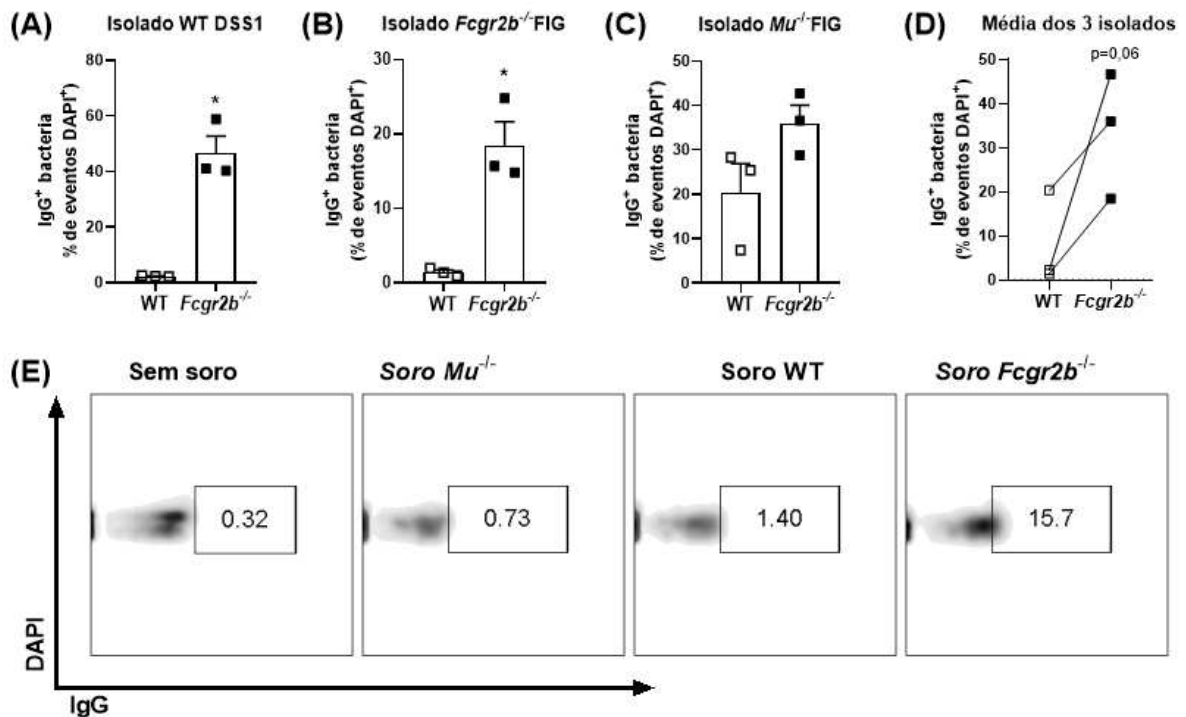
Contudo, tanto animais WT quanto animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentam IgG circulante capaz de se ligar a isolados disbióticos, mesmo aqueles provenientes da microbiota de hospedeiros distintos.



**Figura 14. Quantificação de Imunoglobulina G anti-bactérias fecais e anti-isolados disbióticos no soro de animais *Mu*<sup>-/-</sup>, WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>.** Foi realizado com o soro de camundongos, nocautes para célula B (*Mu*<sup>-/-</sup>), selvagens (C57/BL6) e deficientes para o receptor de IgG FcγRIIB (*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>), um ensaio de ELISA para IgG reativo a antígenos de (A) bactérias fecais, (B) isolado disbiótico coletados de fezes animais WT submetidos à colite (WT DSS1) (C) isolado disbiótico obtido do fígado de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos à colite (*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>FIG) e (D) antígeno do isolado obtido do fígado de um animal *Mu*<sup>-/-</sup> submetido a colite (*Mu*<sup>-/-</sup>FIG). O.D.: Densidade óptica. As barras representam a média ± erro padrão. N= soros de 3 animais por grupo. \*P<0,05.

O próximo passo da caracterização envolveu a avaliação da capacidade de opsonização dos isolados pelo IgG circulante dos animais WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> por citometria de fluxo. Houve detecção de IgG ligada aos três isolados após exposição ao soro de animais WT ou *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, sendo que a percentagem de bactérias ligadas a IgG foi bastante heterogênea a depender do isolado e do soro utilizado (Figura 15A-E). A percentagem de bactérias ligadas a IgG variou de 1,4% (isolado de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> exposto a soro de animais WT – Figura 15B) a até 60% (isolado de animais WT exposto a soro de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> – Figura 15A) Porém, a percentagem de IgG ligada aos isolados foi significativamente maior quando os mesmos foram expostos ao soro de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, se comparado quando foram expostas ao soro de animais WT (Figura 15A-E). A figura 15E mostra um dot plot representativo dos

resultados expressos na Figura 15B. Assim, podemos concluir que houve maior opsonização dos isolados quando expostos ao soro de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>.



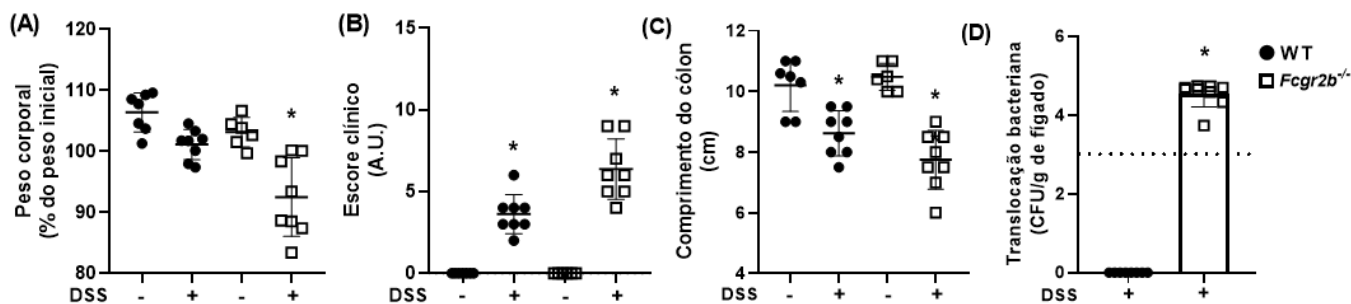
**Figura 15. Opsonização de isolados disbióticos por soros de animais *Mu*<sup>-/-</sup>, WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>.** Os isolados disbióticos obtidos de animais nocautes para célula B (*Mu*<sup>-/-</sup>), selvagens (C57/BL6) e deficientes para o receptor de IgG FcγRIIB (*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>) foram opsonizados com o soro ativado do seu respectivos genótipo e combinados entre si. Posteriormente as bactérias foram marcadas com um anticorpo anti-IgG e DAPI. (A) IgG ligada ao isolado WT DSS1, (B) IgG ligada ao isolado *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>FIG, (C) IgG ligada ao isolado *Mu*<sup>-/-</sup>FIG, (D) Média dos três isolados. (E) Plots representativos de bactérias não opsonizadas, opsonizadas com soro de animal *Mu*<sup>-/-</sup>, WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>. As barras representam a média ± erro padrão. N= soro de 3 animais por grupo. \*P<0,05.

Em conjunto, estes dados demonstram que o repertório de IgG de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> reativo a antígenos provenientes da microbiota fecal e de isolados obtidos da microbiota de animais com colite ulcerativa é diferente daquele de animais WT, sugerindo que há uma resposta imune humoral mais acentuada contra essas bactérias nos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>.

#### **4.5 Caracterização da doença e da produção de citocinas e quimiocinas durante a colite em animais selvagens (WT) deficientes para o receptor de IgG FcγRIIB (*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>)**

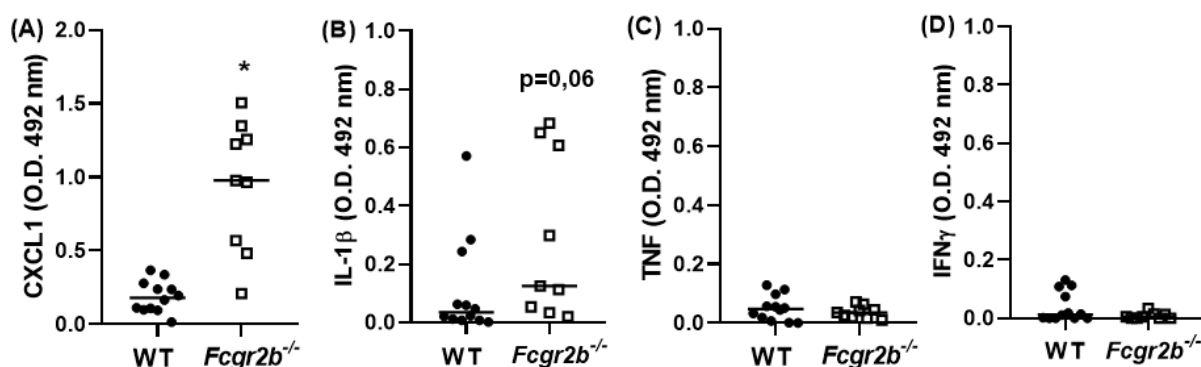
Após caracterização do perfil de IgG dos animais selvagens e deficientes para o receptor FcγRIIB, passamos para a etapa de caracterização do modelo de colite induzida por DSS nestes animais, para posterior análise de parâmetros inflamatórios e microbiológicos. Conforme identificado no trabalho de Fagundes e colaboradores, 2021, animais deficientes para o receptor FcγRIIB apresentam um fenótipo de colite induzida por DSS mais severo quando comparados com animais WT submetidos ao mesmo protocolo experimental.

Para isso, realizamos experimentos envolvendo dois grupos de animais de cada linhagem (WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>), onde um grupo recebeu apenas água (grupo controle) e outro foi exposto ao DSS (2,5%). O protocolo experimental adotado consistia em manter os animais expostos ou não a DSS durante 8 dias. Neste período acompanhamos o peso e alguns sinais clínicos, como consistência das fezes e sinais de morbidade, para determinação do escore clínico. Em relação aos animais selvagens, a única diferença significativa observada foi em relação ao comprimento do cólon, em que o grupo exposto ao DSS apresentou encurtamento do cólon quando comparado com o seu respectivo controle (figura 16C). Animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> expostos ao DSS apresentaram maior perda de peso e elevado escore clínico quando comparados aos seus respectivos controles, como podemos ver na figura 16A-B. O comprimento do cólon também apresentou uma maior redução neste grupo de animais. Além dos sinais clínicos avaliamos o processo de translocação bacteriana para o fígado e, de forma interessante, apenas os camundongos *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> do grupo DSS apresentaram translocação de bactérias para o fígado, como podemos observar na figura 16D.



**Figura 16. Caracterização da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>.** A colite foi induzida por meio da administração de DSS na concentração de 2,5% na água de beber durante 8 dias em camundongos selvagens (C57/BL6) e deficientes para o receptor de IgG FcγRIIB. Neste experimento foi coletado cólon, fígado, fezes e soro dos animais. O fígado foi macerado e plaqueado por microgotas em placas contendo meio Mueller Hinton para contagem de unidades formadoras de colônia (CFU), O cólon e fezes foram utilizados para avaliação dos parâmetros necessários para determinação do escore clínico. (A) Perda de peso corporal, (B) Escore clínico, (C) Comprimento do cólon e (D) Translocação bacteriana para o fígado. As barras representam a média ± erro padrão. A.U.: unidades arbitrárias. As barras representam a média ± erro padrão. N= 7 à 8 animais por grupo. \*P<0,05 camundongos DSS Vs controle.

Após a caracterização da doença e observação do fenótipo nosso próximo passo foi avaliar o processo inflamatório. Com o cólon coletado dos animais realizamos a quantificação de algumas citocinas e quimiocinas por meio do ensaio de ELISA. Como demonstrado na figura 17A, animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentaram uma inflamação acentuada após exposição ao DSS, associado à maior produção da quimiocina CXCL1, quando comparados aos animais selvagens também submetidos à colite. Além da citocina CXCL1, também avaliamos as concentrações de IL-1β, TNF e IFNγ. Contudo, não foi observado um aumento significativo em nenhum dos grupos submetidos à colite para essas citocinas (figura 17B-D).

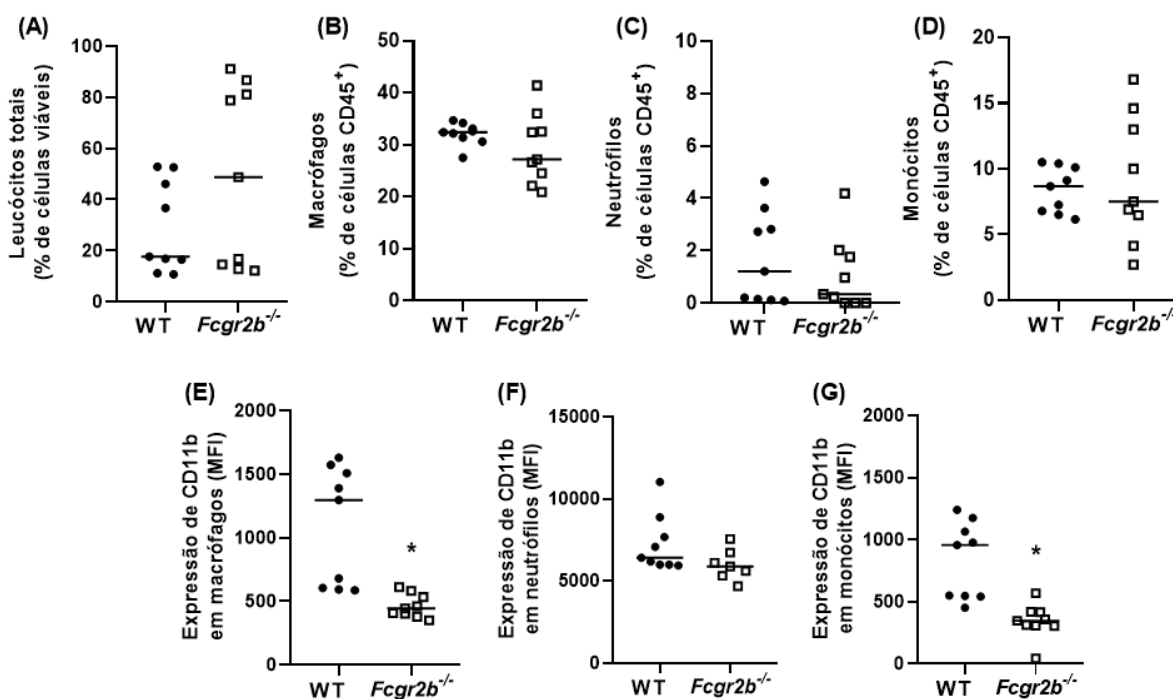


**Figura 17. Quantificação de citocinas e quimiocinas do cólon de animais WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> com colite induzida por DSS.** Foi realizado com o cólon de camundongos, selvagens (C57/BL6) e deficientes para o receptor de IgG *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, submetidos à colite induzida por DSS (DSS 2,5% por 8 dias) um ensaio de ELISA para a quantificação das citocinas e quimiocinas IL-1 $\beta$ , CXCL1, TNF e IFN $\gamma$ . (A) CXCL1, (B) IL-1 $\beta$  e (C) TNF e (D) IFN $\gamma$ . O.D.: Densidade óptica. As barras representam a média. N= 9 a 11 animais por grupo. \*P<0,05.

#### 4.6 Expressão de iNOS por leucócitos no cólon após indução da colite em animais WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>

Outro ponto de interesse neste trabalho era avaliar quando e em que tipos celulares se dá a expressão de iNOS em animais selvagens e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos ao modelo de colite ulcerativa. Assim, executamos o protocolo experimental de indução de colite, no oitavo dia realizamos a eutanásia dos animais, e coletamos amostras de cólon para isolamento de leucócitos da lâmina própria intestinal e marcação destes leucócitos para posterior análise por citometria de fluxo. O primeiro parâmetro avaliado envolveu a caracterização dos tipos celulares que estavam presentes no cólon dos animais. Conforme observamos na figura 18A-D, ambos os genótipos apresentaram uma quantidade semelhante de todos os tipos celulares analisados, sendo os macrófagos a população mais abundante no cólon dos dois grupos submetidos à colite. Neste protocolo experimental de exposição ao DSS por oito dias, também observamos que, em animais WT submetidos à colite, as populações de células imunes avaliadas apresentaram uma maior expressão de CD11b, sendo que nos macrófagos e monócitos isolados do cólon de animais desse grupo há maior marcação para CD11b quando comparado aos leucócitos isolados do cólon de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> (figura 18C e G). Apenas nos neutrófilos não foi possível visualizar essa diferença de expressão deste marcador entre as

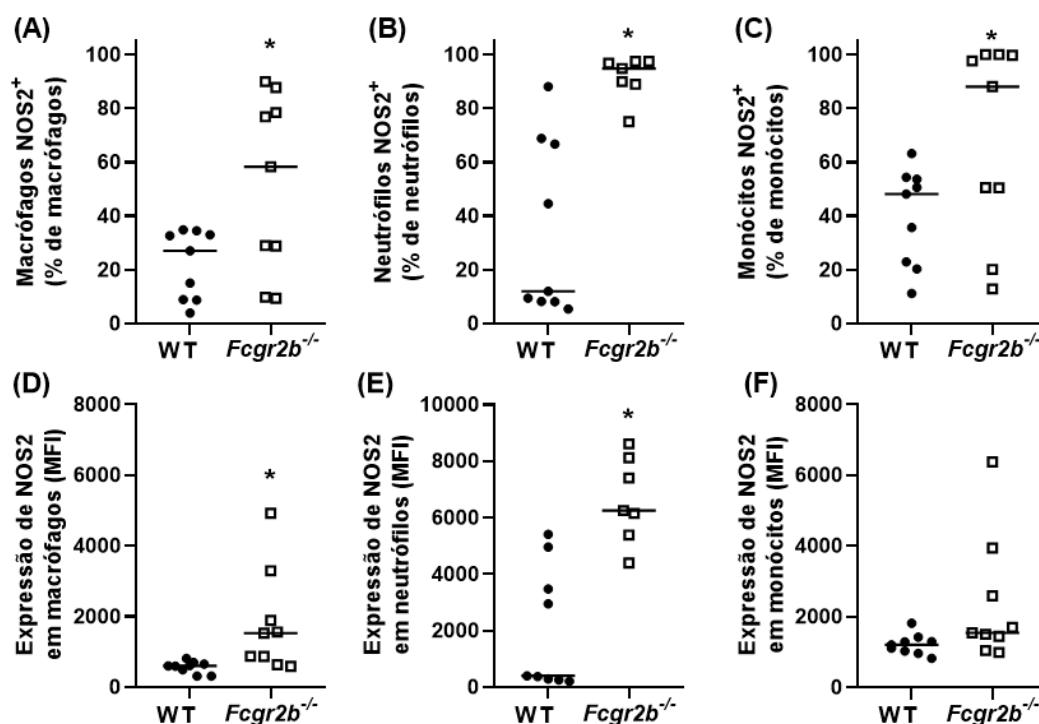
células dos dois genótipos (figura 18D). Este dado sugere que animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentam uma menor quantidade de células imunes ativadas após oito dias de indução da colite.



**Figura 18. Populações de células imunes presentes no cólon de camundongos WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> e seu perfil de ativação após indução de colite.** Animais selvagens e nocautes para o receptor *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> foram submetidos a colite induzida por DSS a 2,5%, no oitavo dia do protocolo experimental realizamos a eutanásia e coletamos o cólon para isolamento de leucócitos da lâmina própria intestinal e marcação destes leucócitos e expressão de CD11b por citometria de fluxo. (A) % de células viáveis de leucócitos totais, (B) % de macrófagos, (C) % de neutrófilos, (D) % de monócitos, (E) Expressão de CD11b em macrófagos, (F) Expressão de CD11b em neutrófilos e (G) Expressão de CD11b em monócitos. N= 9 animais por grupo. As barras representam a média. \*P<0,05.

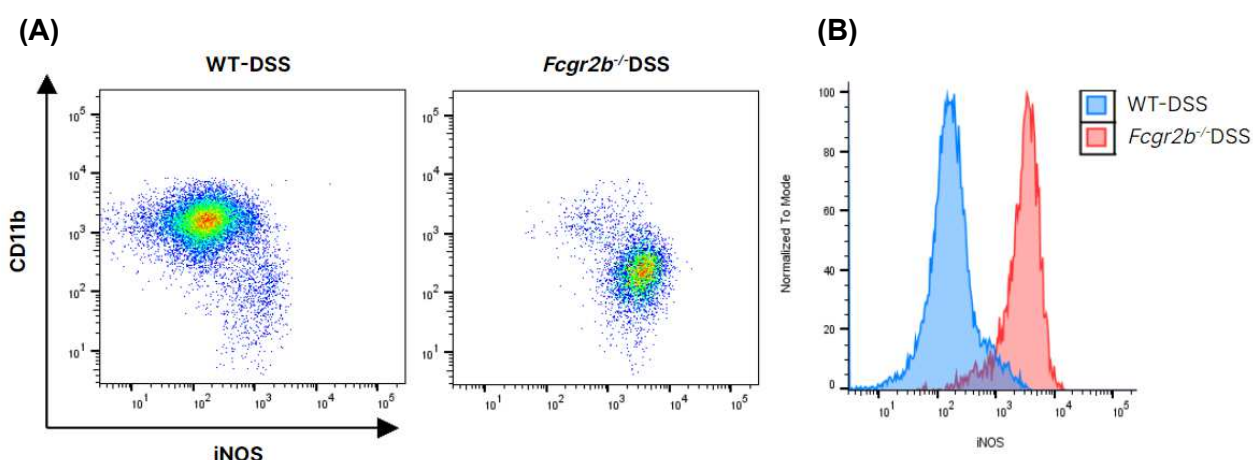
Em relação a produção de óxido nítrico pelas populações de células imunes avaliadas, observamos que a porcentagem de células iNOS-positivas em animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> foi significativamente maior quando comparados com a das células obtidas dos animais WT (figura 19A-C). Além da maior porcentagem de células positivas, a intensidade média de marcação para iNOS foi maior entre os macrófagos e neutrófilos dos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> do que aquela observada nos leucócitos isolados do tecido de animais WT (figura 19D-F). Este dado sugere que as células imunes de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> produzem maior quantidade de óxido

nítrico quando há ativação destas após indução da colite. Em conjunto, os dados de citometria indicam que os leucócitos de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentam um perfil de ativação distinto das células de animais WT após indução da colite. Conforme demonstrado na figura 20A-B, macrófagos de animais WT possuem maior expressão de CD11b e menor expressão de iNOS que os macrófagos de animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, que apresentam uma inversão desse padrão de ativação, com baixos níveis de CD11b e elevada expressão de iNOS. Dessa forma, com esses dados podemos sugerir que a IgG, via ativação do receptor *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, é importante para instruir a ativação dos macrófagos, induzindo aumento de CD11b e reprimindo a produção de NO. A maior produção de NO implica em maior concentração de nitrato no ambiente intestinal, que confere uma vantagem metabólica a alguns táxons bacterianos da microbiota (Winter et al., 2013).



**Figura 19. Expressão de iNOS em populações de células imunes presentes no cólon de camundongos WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>.** Animais selvagens e nocautes para o receptor FcγRIIB foram submetidos a colite induzida por DSS a 2,5%, no oitavo dia do protocolo experimental realizamos a eutanásia e coletamos o cólon para isolamento de leucócitos da lâmina própria intestinal e marcação de iNOS nestes leucócitos por citometria de fluxo. (A-C) Porcentagem de (A) macrófagos NOS2<sup>+</sup>, (B) neutrófilos NOS2<sup>+</sup> e (C) monócitos NOS2<sup>+</sup>. (D-F) Expressão de NOS2 em M.F.I. dos seguintes tipos celulares (D) macrófagos, (E) neutrófilos e (F) monócitos.

M.F.I.: Intensidade Mediana de Fluorescência. N= 9 animais por grupo. As barras representam a média. \*P<0,05.



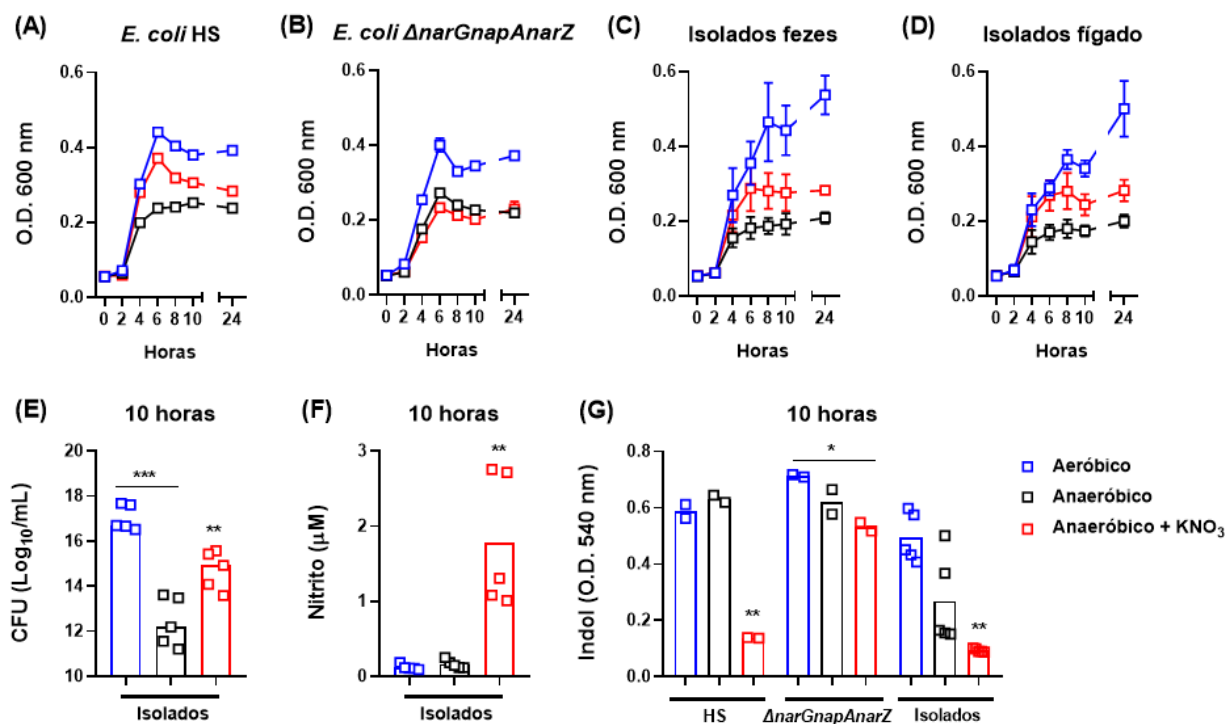
**Figura 20. Expressão de iNOS em populações de macrófagos presentes no cólon de camundongos WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>.** Animais selvagens e nocautes para o receptor FcγRIIB foram submetidos a colite induzida por DSS a 2,5%, no oitavo dia do protocolo experimental realizamos a eutanásia e coletamos o cólon para isolamento de leucócitos da lâmina própria intestinal e marcação de macrófagos, CD11b e iNOS por citometria de fluxo. (A) Expressão de CD11b (eixo Y) e iNOS (eixo X) nos macrófagos de camundongos WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos à colite. (B) Histogramas de expressão de iNOS nos macrófagos dos dois grupos com DSS. N= 9 animais por grupo.

#### 4.7 Isolados disbióticos de animais submetidos à colite são capazes de usar nitrato como aceptores finais de elétrons *in vitro*.

Buscamos então investigar a capacidade dos isolados disbióticos em utilizar nitrato como aceptores finais de elétrons. Seleccionamos os isolados de *E. coli* do biobanco do LIMHO que haviam sido identificadas anteriormente e demos seguimento aos testes *in vitro*. Para testar nossa hipótese cultivamos os isolados disbióticos e duas linhagens de *E. coli*, uma mutante para utilização de nitrato como acceptor final de elétrons ( $\Delta narGnapAnarZ$ ) e a linhagem selvagem (HS), em diferentes condições de crescimento em caldo LB: crescimento anaeróbico, anaeróbico em caldo LB suplementado com nitrato de potássio (10mM) e crescimento aeróbico. Conforme ilustrado na figura 21A-D, construímos curvas de crescimento para visualizar como as diferentes condições poderiam impactar no crescimento bacteriano. Como esperado, em aerobiose todas as linhagens apresentaram crescimento

elevado em comparação com o crescimento em anaerobiose. Contudo, quando o caldo LB foi suplementado com nitrato de potássio na condição de anaerobiose, houve incremento significativo do crescimento bacteriano tanto dos isolados de fezes, quanto dos isolados do fígado, seguindo o padrão observado na linhagem padrão *E.coli* HS. A linhagem *ΔnarGnapAnarZ*, em contrapartida apresentou crescimento semelhante nos meios com ou sem suplementação de nitrato em anaerobiose (figura 21B). Além do acompanhamento da taxa de crescimento feito por meio da leitura da absorbância, também realizamos a contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Na figura 21E podemos observar a contagem de CFU 10h após inoculação no meio de cultivo dos isolados disbióticos. Novamente em aerobiose vemos uma quantidade maior de colônias quando comparado com ambas as condições de anaerobiose, porém como visto anteriormente na curva de crescimento, a quantidade de colônias aumentou significativamente quando houve suplementação de nitrato de potássio na condição de anaerobiose. Estes dados mostraram que a adição de nitrato ao meio favoreceu o crescimento em anaerobiose dos isolados disbióticos e da linhagem de *E.coli* HS mas não da linhagem *ΔnarGnapAnarZ*.

Além das curvas de crescimento coletamos o sobrenadante das culturas para quantificação de nitrito e indol (figura 21F-G). Conforme observamos na figura 21F foi detectado nitrito no sobrenadante de cultura dos isolados cultivados em anaerobiose com suplementação de nitrato, mas não nas demais condições de cultivo, sugerindo que houve conversão do nitrato a nitrito durante a respiração anaeróbia por parte dos isolados. Em relação ao indol, vimos uma inversão de padrão observado para o nitrito. Nas condições de aerobiose e anaerobiose sem nitrato vimos uma maior quantidade de indol nos isolados e na linhagem HS, porém quando houve a suplementação de nitrato vimos uma diminuição significativa na produção de indol nessas linhagens. Apenas a linhagem *ΔnarGnapAnarZ* manteve a produção de indol nas três condições de crescimento. Estes resultados sugerem que a produção de indol está sendo influenciada pela respiração anaeróbica utilizando nitrato como acceptor de elétrons.

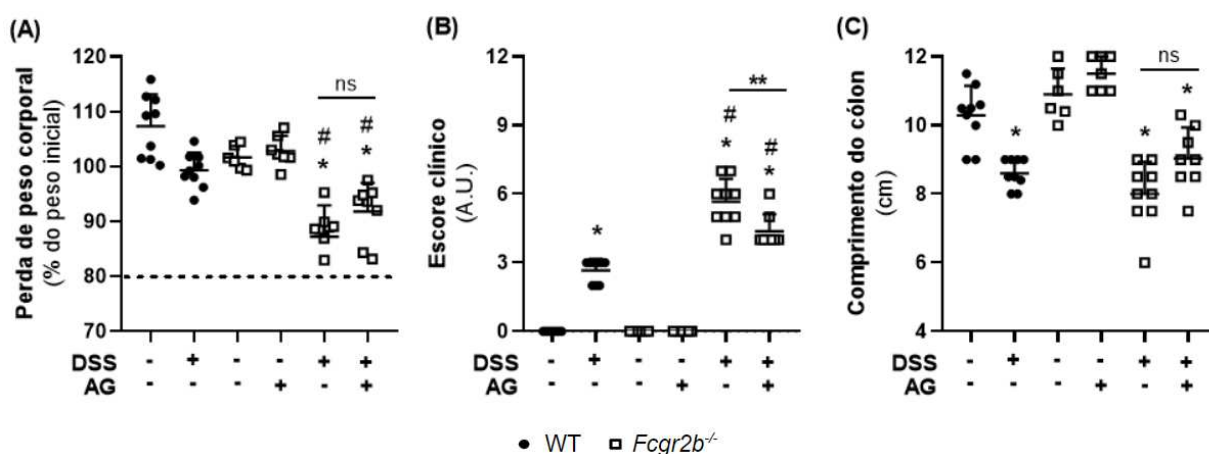


**Figura 21.** Curvas de crescimento de diferentes linhagens de *E. coli* cultivadas em meios contendo diferentes aceptores de elétrons respiratórios. Os isolados disbióticos e duas linhagens de *E. coli*  $\Delta narGnapAnarZ$  e HS foram cultivados em diferentes condições de crescimento em caldo LB, sendo eles crescimento aeróbico, anaeróbico e anaeróbico com suplementação de nitrato. O crescimento foi monitorado de hora em hora durante 10 horas, com uma leitura final no ponto de 24h após incubação, por meio da leitura na OD600nm. Também coletamos sobrenadante para quantificação de nitrito e indol nos pontos de 2, 4, 6, 10 e 24 horas. (A) HS, (B)  $\Delta narGnapAnarZ$ , (C) bactérias isoladas das fezes de camundongos submetidos à colite, (D) bactérias isoladas dos fígados de camundongos *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> também submetidos à colite. (E) Contagem de CFU e (F) quantificação de nitrito dos isolados. (G) quantificação de indol dos isolados e das linhagens de *E. coli* HS e  $\Delta narGnapAnarZ$ . \*Aeróbico vs Anaeróbico KNO<sub>3</sub>, \*\*Aeróbico vs Anaeróbico KNO<sub>3</sub> e Anaeróbico vs Anaeróbico KNO<sub>3</sub>, \*\*\*Aeróbico vs Anaeróbico.

#### 4.8 Nitrato como acceptor final de elétrons favorece translocação da população bacteriana para o fígado durante a colite ulcerativa em *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>

Como últimos objetivos para este trabalho avaliamos se o uso de nitrato como acceptor final de elétrons confere alguma vantagem competitiva para bactérias, favorecendo a

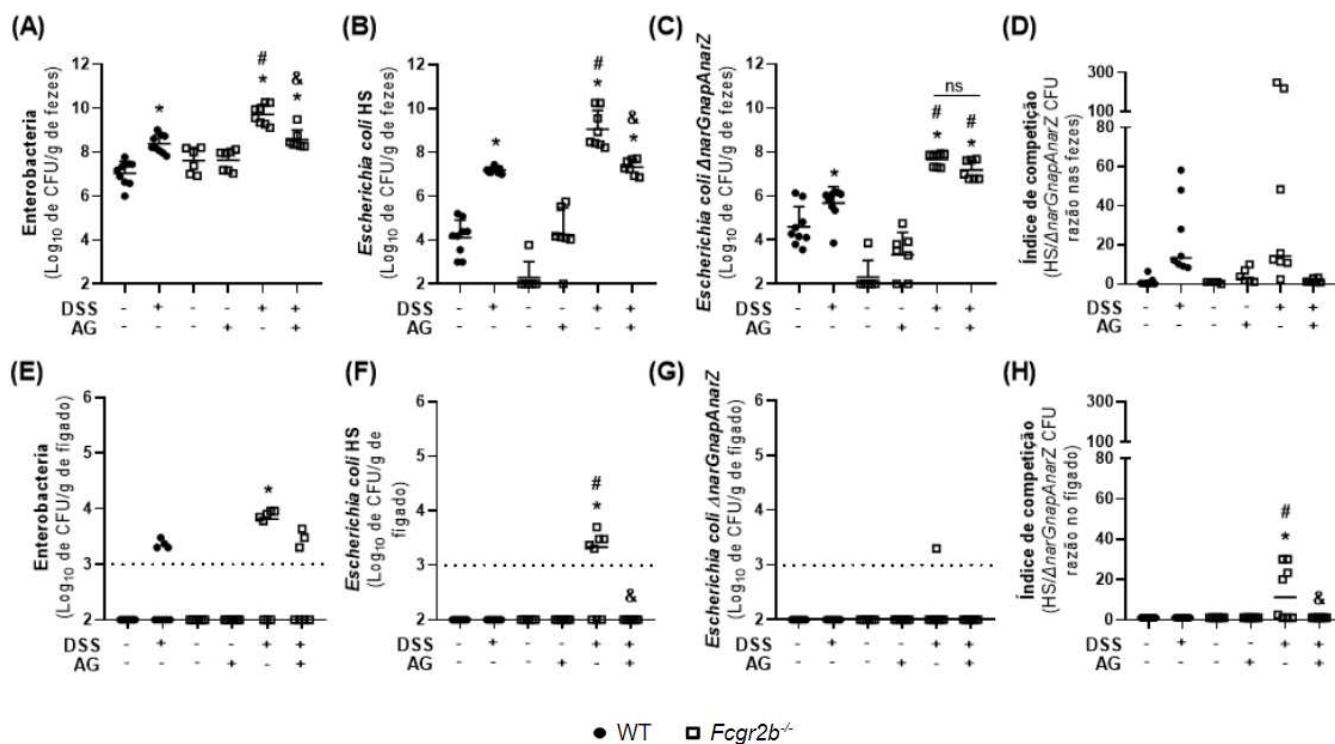
expansão da população bacteriana durante a colite ulcerativa em animais selvagens e *Fcgr2b<sup>-/-</sup>*, e determinar se a inibição de iNOS altera a expansão dessas bactérias que utilizam nitrato. Para isso, utilizamos animais WT e *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* divididos em grupos de animais controle e de animais que receberam o DSS a 2,5% na água de beber durante 8 dias. Ainda, os animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* foram alocados em dois grupos adicionais que receberam aminoguanidina (AG) a partir do terceiro dia do protocolo experimental, sendo eles animais água+AG e animais DSS+AG. Todos os grupos foram gavados com  $10^7$  CFU/animal de cada uma das linhagens *E. coli* HS e *AnarGnapAnarZ* no quinto dia do protocolo experimental. Primeiramente fizemos a caracterização da doença e observamos resultados similares aos experimentos realizados anteriormente. Como podemos ver na figura 22A, animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* submetidos à colite apresentaram maior perda de peso quando comparados ao seu controle e também aos animais WT submetidos ao mesmo protocolo. O escore clínico (Figura 22B) seguiu o mesmo padrão entre os dois grupos, porém não foi detectada diferenças entre o comprimento do cólon dos animais submetidos à colite dos dois genótipos, que se apresentavam mais curtos que o cólon dos respectivos controles (Figura 22C). Em relação a adição do inibidor de iNOS, a aminoguanidina, observamos uma melhora no escore clínico dos animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* submetidos à colite, sem alterações dos demais parâmetros (Figura 22A-C). Estes dados indicam que a inibição da atividade da iNOS gera uma melhora no quadro clínico de animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>*.



**Figura 22.** Caracterização da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos WT e *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* submetidos ao ensaio e competição de linhagens de *E. coli* e expostos ou não à aminoguanidina. A colite foi induzida por meio da administração de DSS na concentração de 2,5% na água de beber durante 8 dias em camundongos selvagens (C57/BL6) e deficientes

para o receptor de IgG FcγRIIB, no terceiro dia do protocolo experimental dois grupos passaram a receber aminoguanidina na água de beber até o oitavo dia. Todos os grupos no quinto dia do experimento foram gavados com  $10^7$  CFU/animal das linhagens de *E.coli* HS e  $\Delta$ NarGnapAnarZ. Neste experimento coletamos fezes, cólon e fígado dos animais. (A) Perda de peso corporal, (B) Escore clínico e (C) Comprimento do cólon. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. A.U.: unidades arbitrárias. N= 6 a 9 animais por grupo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. \*P<0,05 camundongos DSS Vs controle # P<0,05 camundongos *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>DSS Vs camundongos WT DSS e \*\*P<0,05 camundongos *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>DSS Vs camundongos *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> DSS + AG. ns.: não significante.

Após a caracterização da doença avaliamos a expansão de enterobactérias e das linhagens de *E. coli* HS e  $\Delta$ NarG nas fezes dos animais. As fezes coletadas dos animais foram maceradas, diluídas em solução de NaCl 0,9% e plaqueadas em três meios diferentes, sendo eles MacConkey, MacConkey com ampicilina e MacConkey com canamicina. Além da quantificação de bactérias por Unidade formadoras de colônia (CFU), também realizamos o índice de competição, que consiste na razão entre o número de colônias da *E. coli* selvagem pelo número de colônias da *E. coli* mutante. Animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos à colite apresentaram uma maior contagem de CFU de enterobactérias nas fezes que os animais WT, conforme ilustrado na figura 23A. Contudo, ao adicionarmos o inibidor de iNOS vemos uma diminuição nessa contagem bacteriana nas fezes dos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, chegando a taxas semelhantes ao observado em animais WT com colite. Ambas as linhagens de *E. coli* inoculadas nos animais conseguiram colonizar o trato gastrointestinal dos animais dos dois genótipos, como é ilustrado nas figuras 23B-C. A contagem de CFUs de *E. coli* HS apresentou resultados semelhantes aos observados para as CFUs de enterobactérias, sendo detectada um aumento da contagem em animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> com colite em relação aos animais WT doentes e uma queda da contagem em animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos a indução da colite e tratados com AG.(figura 23B). Em relação a *E. coli* mutante, houve maior contagem de CFUs desta linhagem nas fezes dos animais FcγRIIB<sup>-/-</sup> submetidos à colite quando comparado aos animais WT expostos a DSS. Porém, o tratamento com aminoguanidina não alterou significativamente a quantidade de CFUs dessa linhagem recuperadas das fezes dos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> (Figura 23C). Não houve diferenças significativas para os índices de competição calculados para as fezes dos diversos grupos experimentais avaliados (Figura 23D).



**Figura 23.** Expansão de enterobactérias durante colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos WT e *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos ao ensaio e competição de linhagens de *E. coli* e expostos ou não à aminoguanidina. A colite foi induzida por meio da administração de DSS na concentração de 2,5% na água de beber durante 8 dias em camundongos selvagens (C57/BL6) e deficientes para o receptor de IgG Fc $\gamma$ RIIB, no terceiro dia do protocolo experimental dois grupos passaram a receber aminoguanidina na água de beber até o oitavo dia. Todos os grupos no quinto dia do experimento foram gavados com 10<sup>7</sup> CFU/mL das linhagens de *E. coli* HS e  $\Delta narGnapAnarZ$ . Neste experimento coletamos fezes, cólon e fígado dos animais. (A) quantificação de enterobactérias das fezes pelas CFUs em ágar MacConkey, (B) quantificação da *E. coli* HS nas fezes pelas CFUs em ágar MacConkey com canamicina, (C) quantificação da *E. coli*  $\Delta narGnapAnarZ$  nas fezes pelas CFUs em ágar MacConkey com ampicilina, (D) Índice de competição *E. coli* HS/ $\Delta narGnapAnarZ$  nas fezes. Avaliação da translocação de (E) enterobactérias, (F) *E. coli* HS e (G)  $\Delta narGnapAnarZ$  para o fígado dos animais. (H) Índice de competição *E. coli* HS/ $\Delta narGnapAnarZ$  no fígado. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. N= 6 a 9 animais por grupo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. \*P<0,05 camundongos DSS Vs controle # P<0,05 camundongos

*Fcgr2b*<sup>-/-</sup>DSS Vs camundongos WT DSS e & P<0,05 camundongos *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>DSS Vs camundongos *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>DSS+AG.

O próximo passo foi avaliar se haveria diferenças para a translocação bacteriana para o fígado no sistema estudado. Foi observada translocação de enterobactérias em alguns animais dos três grupos que foram submetidos à colite. Contudo, apenas os animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> que receberam DSS apresentaram uma translocação de enterobactérias estatisticamente significativa quando comparada ao seu respectivo controle (Figura 23E). Este grupo também foi o único que apresentou translocação de *E. coli* HS para o fígado, sendo esse resultado significativamente diferente do respectivo grupo controle e do grupo WT que recebeu DSS (Figura 23F). Não foram detectadas contagens significativas de CFUs da linhagem mutante em nenhum dos grupos experimentais (Figura 23G). Diante disso, o índice de competição entre as duas linhagens de *E. coli* foi significativamente maior em animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> tratados com DSS tanto quando comparado com os animais WT que receberam DSS quanto com animais do grupo *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> DSS+AG. Estes dados sugerem que o NO excedente favorece o processo de translocação de bactérias que utilizam nitrato como acceptor final de elétrons durante respiração anaeróbica.

## 5 Discussão

A etiologia das doenças inflamatórias intestinais ainda é um enigma, contudo é importante ressaltar quatro fatores que influenciam diretamente na patogênese destas: suscetibilidade genética, ambiente externo, microbiota intestinal e resposta imune do hospedeiro (Kim & Cheon, 2017; Zhou et al., 2017; Jarmakiewicz-Czaja et al 2022). Alguns trabalhos, como o de Zhou e colaboradores, 2017, sugerem que respostas imunes aberrantes contínuas à microbiota de indivíduos suscetíveis geneticamente podem causar o desencadeamento dessas doenças. Na literatura há relatos que associam a microbiota e os marcadores sorológicos com as doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Estes tentam traçar perfis da microbiota de acordo com o diagnóstico da doença e mostrar quais marcadores sorológicos melhor caracterizam aquele diagnóstico (Cohavy et al., 2000; Lodes et al., 2004; Targan et al., 2005; Sitaraman et al., 2005; Ferrante et al., 2007; Schirmer et al., 2019).

Os marcadores sorológicos mais estudados são o anticorpo anti-neutrófilo (ANCA) e os anticorpos contra epítomos de manose da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Diversos estudos relatam uma possível utilização destes marcadores como diferenciais entre DC e UC. A maioria dos pacientes diagnosticados com colite ulcerativa apresentam altos títulos de ANCA e pacientes diagnosticados com Doença de Crohn mostraram maiores títulos de ASCA. A presença de Anti-OmpC e anti-CBir1 são mais elevados também em pacientes com DC (Targan et al., 2005; Papp et al., 2007; Ferrante et al., 2007). Estes dados são consistentes com os analisados neste trabalho, no qual observamos que todos os pacientes diagnosticados com UC foram agrupados ao grupo ANCA. Contudo, neste grupo também observamos uma alta presença (39,3%) de pacientes diagnosticados com DC e 14,3% deste grupo correspondia a pacientes sem qualquer DII diagnosticada. A identificação de altos títulos dos três marcadores sorológicos analisados nos pacientes sem DII podem indicar que esses membros da coorte, mesmo sem apresentarem características diagnósticas que os encaixassem nos dois perfis de doença ainda sim mostravam um processo inflamatório e imunológico semelhante aos grupos no qual se agruparam.

Devido ao avanço nos estudos envolvendo tecnologias multi ômicas tornou-se possível encontrar genes e variantes associados à suscetibilidade à DII, levando até o momento à descoberta cerca de 240 loci (Mirkov et al., 2017; Park & Jeon, 2019; Guan, 2019; Jarmakiewicz-Czaja et al 2022; Jans & Cleynen, 2023). Estes genes desempenham papéis em importantes vias de manutenção da homeostase intestinal, como defesa inata e adaptativa, função de barreira epitelial, autofagia, além de vias metabólicas (Guan, 2019; Jarmakiewicz-Czaja et al 2022). A maioria dos genes relacionados à suscetibilidade a doenças inflamatórias intestinais como NOD2 (Proteína com domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos tipo 2), CARD9 (membro da família do domínio de recrutamento de caspases 9), CLEC7A (Proteína contendo domínio de lectina tipo C 7A), CTLA4 (Proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4), NFKBIZ (zeta inibidor de NFκB), ATG16L1 (proteína 1 semelhante a ATG16), NFATC1 (Fator nuclear de células T ativadas 1) e LAMB1 (Laminina Subunidade Beta 1) (Zhou et al., 2017) não foram diferencialmente expressos entre os grupos avaliados no presente trabalho. Contudo, observamos, destacadamente, genes diferencialmente expressos relacionados ao processo inflamatório e a resposta imune. O grupo com maiores títulos de ANCA apresentou um perfil de expressão de genes inflamatórios mais acentuado quando comparamos com o grupo anti-CBir1, incluindo genes como *NOS2*,

*CXCL1, IL1, IL17A, IL13* . No trabalho de Massicotte-Azarniouch e colaboradores, 2022, foi observado que, durante a vasculite, estímulos inflamatórios levam a expressão de autoantígenos e a produção de ANCA. Foi relatado também que por induzir produção aumentada de citocinas inflamatórias, ANCA levaria à ativação de neutrófilos, produção e liberação de substâncias citotóxicas e ativação de vias alternativas do complemento, criando assim um intenso meio inflamatório. Este mecanismo de retroalimentação poderia justificar este perfil inflamatório exacerbado no grupo ANCA, mostrando o papel do anticorpo na manutenção da inflamação.

O desequilíbrio na microbiota durante a DII pode interromper processos regulatórios que suprimem a inflamação. Alguns trabalhos demonstram que a microbiota de pacientes com DII codificam mais vias de estresse oxidativo e transporte de nutrientes e menos vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos e síntese de aminoácidos (Morgan et al., 2012; Schirmer et al., 2019). Essa mudança de vias está relacionada diretamente à mudança que ocorre na microbiota durante as doenças inflamatórias intestinais. Indivíduos com DII geralmente apresentam uma diminuição da diversidade da microbiota. Segundo trabalho de Jarmakiewicz-Czaja e colaboradores, 2022, pacientes com DII têm maior abundância de membros do grupo Bacteroidetes e Proteobacteria, como Enterobacteriaceae (incluindo *Escherichia coli* ) e um número menor de Firmicutes (por exemplo, lactobacillus). Schirmer e colaboradores, 2019, descreveram em seu trabalho táxons que estavam aumentados e reduzidos durante a doença de Crohn e colite ulcerativa. Os perfis entre os dois subtipos de DII foram semelhantes, apresentando 87 dos táxons associados tanto à UC quanto à DC. A família com maior número de táxons aumentados foi a família Enterobacteriaceae, enquanto o maior número de táxons diminuídos na DC pertenciam às famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae. Já na UC os táxons aumentados eram da família Lachnospiraceae e os táxons diminuídos eram em grande parte da família Bacteroidaceae. Assim, parece ser possível distinguir a composição taxonômica e funcional da microbiota intestinal entre pacientes com DC ou UC.

Devido aos novos agrupamentos construídos baseados no fenótipo sorológico dos pacientes, não pudemos definir táxons característicos de cada diagnóstico presente na coorte. Contudo, foi possível associar a composição da microbiota em relação ao perfil sorológico do paciente. Quando comparamos o fenótipo sorológico ANCA e anti-CBir1 observamos que

não havia diferenças entre a diversidade e a estrutura da microbiota neste grupo, porém foi possível identificar táxons com abundâncias aumentadas ou reduzidas. No grupo ANCA identificamos 18 táxons que apresentaram aumento relativo das abundâncias, sendo as famílias Enterobacteriaceae e Ruminococcaceae com mais táxons mais abundantes. 22 táxons tiveram sua abundância reduzida, sendo as famílias Lachnospiraceae e Porphyromonadaceae aquelas com maior número de táxons menos abundantes no grupo ANCA.

Dentre os membros da família Enterobacteriaceae com maior abundância no grupo de pacientes ANCA, podemos destacar os gêneros *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter* e *Proteus* ( $p < 0,05$ ), sendo que já foram descritas associações entre estes táxons e a sinalização de citocinas e inflamação da mucosa (Harley e Karp 2012; Cavalcante et al., 2020). A identificação destes anaeróbios facultativos super-representados no grupo ANCA, apoia as hipóteses publicadas anteriormente de que estas bactérias podem estar aumentadas em parte devido a perda da hipóxia no intestino inflamado (Morgan et al., 2012; Schirmer et al., 2019), além da alta produção de NO no lúmen intestinal, visto que membros desta família são capazes de utilizar nitrato, N-óxidos e S-óxidos como aceptores finais de elétrons na respiração anaeróbia (Winter et al., 2013). Porém, o aumento de abundância de membros da família Ruminococcaceae na microbiota deste grupo de pacientes não é condizente com o perfil inflamatório observado no grupo ANCA, visto que membros desta família pertencem a classe de bactérias produtoras ácidos graxos de cadeia curta no intestino humano, sendo responsáveis por degradar polissacarídeos complexos (Nagao-Kitamoto e Kamada, 2017; Cavalcante et al., 2022). Contudo, nossos achados são consistentes com o trabalho de Andoh e colaboradores, 2007, que observaram a presença de membros dos gêneros *Ruminococcus*, *Eubacterium* e *Fusobacterium* em pacientes com UC, mas não em indivíduos saudáveis. No presente trabalho a abundância destes grupos estava aumentada nos grupos de fenótipo sorológico ANCA quando comparado ao grupo anti-CBir1. Aparentemente, mesmo com a alta abundância de membros desta família no grupo ANCA, não vimos uma influência no processo inflamatório.

Diante dos achados relatados até aqui podemos sugerir que o perfil sorológico influencia tanto na sua expressão gênica quanto na composição da microbiota. A partir deste ponto hipotetizamos que a resposta inflamatória exacerbada decorrente de títulos de IgG anti-microbiota alterados poderia favorecer alterações na composição da microbiota e

buscamos testar essa hipótese em um modelo experimental murino de colite ulcerativa. Segundo o trabalho De Brito e colaboradores, 2022, animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* apresentam concentrações de anticorpo anti-microbiota fecal diferentes dos animais selvagens e esse repertório alterado parece impactar no desenvolvimento de respostas inflamatórias intestinais. Desta forma, buscamos avaliar se essa diferença no perfil sorológico destes animais levaria também a diferenças no perfil microbiológico e inflamatório durante a colite ulcerativa.

O trabalho de Fagundes e colaboradores, em 2021, mostraram que animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* submetidos à colite induzida por DSS apresentavam maior susceptibilidade à doença. A partir do quinto dia após indução da colite, apresentaram redução acentuada no peso corporal, maior escore clínico, lesão tecidual mais grave, expansão acentuada de enterobactérias e translocação de bactérias para o fígado. Além disso, esses animais apresentavam um maior número de células positivas para iNOS no cólon quando comparados com animais WT após indução da colite (Fagundes, 2021).

Após observação desse fenótipo de suscetibilidade que animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* apresentavam, objetivamos traçar o perfil sorológico destes animais. No trabalho de Zeng e colaboradores, 2016, foi demonstrado que a microbiota intestinal gera resposta homeostática de IgG a antígenos bacterianos. Além disso, os anticorpos IgG anti-comensais também são capazes de opsonizar patógenos para mediar a eliminação destes (Zeng et al., 2016). Assim, avaliamos como seriam essas respostas de IgG nos animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>*. O que observamos no presente trabalho foi que animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* tinham altos títulos de IgG anti-bactérias fecais e anti-isolados disbióticos, superando os níveis de animais WT mesmo antes de serem submetidos ao protocolo de colite. O soro dos animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* também foram mais eficientes em opsonizar isolados disbióticos. Estes dados sugerem que seria possível traçar um paralelo entre animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* submetidos à colite e grupo de fenótipo sorológico ANCA, por apresentarem títulos alterados de IgG reativos a antígenos microbianos e indícios de uma inflamação exacerbada.

Ao avaliarmos a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no cólon dos animais *Fcgr2b<sup>-/-</sup>* submetidos ao modelo de colite induzida por DSS, observamos que estes animais apresentam maiores concentrações de CXCL1 no cólon quando comparados com animais WT também submetidos a este modelo. Este dado corrobora a conclusão de que estes animais apresentam uma resposta inflamatória acentuada durante a colite. Como foi visto

anteriormente, os animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, apresentavam maior número de células iNOS<sup>+</sup> quando comparados aos animais WT (Fagundes et al., 2021). Assim passamos a investigar em que tipos celulares se daria essa expressão acentuada de iNOS, buscando determinar se haveria alguma mudança no padrão de ativação das células imunes em animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos ao modelo de colite ulcerativa.

O que observamos foi que animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentam uma menor quantidade de células imunes positivas para CD11b após oito dias de colite. Contudo, estas células parecem produzir mais óxido nítrico do que as células dos animais WT, uma vez que apresentam maior expressão da enzima iNOS. Estes dados nos levaram a concluir que as células destes dois genótipos apresentavam diferentes padrões de ativação durante a colite ulcerativa: células de animais WT expressariam mais CD11b e menos iNOS, ao passo que as células dos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> apresentam uma inversão desse padrão de ativação, com menor expressão de CD11b e maior expressão de iNOS após indução da colite. Dessa forma, sugerimos que o receptor FcγRIIB, além de possuir um papel de regular negativamente a expressão de NOS2 no cólon dos animais durante a colite ulcerativa, como visto anteriormente (Fagundes et al., 2021), também é importante para instruir a ativação dos macrófagos, reprimindo a produção de NO e induzindo aumento de CD11b.

Buscando entender melhor a relação entre IgG, iNOS e a microbiota, avaliamos se *Escherichia coli*, um membro da família Enterobacteriaceae, era capaz de se beneficiar do nitrato, derivado de NO, que estaria disponível durante o processo inflamatório típico da colite ulcerativa. Alguns trabalhos já demonstraram que o ambiente intestinal inflamatório impõe um custo de aptidão a alguns microrganismos comensais e fornece uma vantagem seletiva para outros capazes de sobreviverem em um ambiente pró-inflamatório (Lee e Chang, 2021). No trabalho de Winter e colaboradores, 2013, foi demonstrado que o nitrato proveniente da resposta inflamatória conferiu uma vantagem de crescimento à bactéria comensal *Escherichia coli* no intestino de camundongos, sugerindo assim que a resposta inflamatória do hospedeiro aumenta seletivamente o crescimento de Enterobacteriaceae comensais, gerando aceptores de elétrons para a respiração anaeróbica. Em nossos experimentos *in vitro* demonstramos a capacidade de utilizar nitrato durante a respiração anaeróbia por parte de diversos isolados de *E. coli* indígenas obtidas de animais submetidos à colite.

Diante da comprovação que *E. coli* comensais seriam capazes de se beneficiar da disponibilidade de nitrato no ambiente, realizamos um ensaio de competição *in vivo*, no qual gavamos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> e WT submetidos à colite induzida por DSS com a *E. coli* HS e a *E. coli*  $\Delta$ narG. Este experimento foi realizado para avaliar o padrão de expansão dessas linhagens no contexto de inflamação gerado nos dois genótipos de animais, esperando que a maior produção de NO observada nos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> levaria uma vantagem competitiva para a linhagem selvagem sobre a linhagem mutante. O primeiro ponto que observamos foi que, de maneira geral, animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> submetidos à colite apresentaram uma maior expansão do conteúdo de enterobactérias na microbiota fecal que aquela observada nos animais WT, e que quando os primeiros receberam um inibidor de iNOS, essa expansão foi reduzida, atingindo taxas semelhantes àquela dos animais WT. Esses resultados foram análogos aos observados para as contagens de *E. coli* HS. Em contrapartida, houve aumento do número de CFUs da linhagem de *E. coli* mutante nas fezes de ambos os genótipos de camundongos submetidos a colite, e o padrão de maior número de CFUs nos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> se manteve. Ainda, tais contagens não foram afetadas pela exposição a AG nos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> tratados com DSS. Assim, não houve diferenças estatisticamente significativas no índice de competição entre as duas linhagens de *E. coli* nas fezes dos diversos grupos experimentais. Esses achados, em conjunto, sugerem que a produção de NO aumentada nos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> não parece ser responsável por conferir uma vantagem para expansão da população de *E. coli* no lúmen do tecido inflamado. Isso poderia estar associado a utilização de outros aceptores finais de elétrons durante a respiração anaeróbica, como N-óxidos e S-óxidos, ou até mesmo devido a realização de respiração aeróbica, visto que durante o processo inflamatório há perda do caráter hipóxico do lúmen intestinal e estas bactérias são capazes de utilizar o oxigênio disponível.

Em contrapartida, houve recuperação de enterobactérias e da linhagem HS, mas não da linhagem mutante de *E. coli*, no fígado dos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>, mas não dos animais selvagens. Ainda, a exposição ao inibidor de iNOS conseguiu barrar essa translocação bacteriana nos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup>. Assim, o índice de competição entre as linhagens selvagens e mutantes no fígado dos animais *Fcgr2b*<sup>-/-</sup> que receberam DSS apresentaram diferenças significativas, o que foi revertido pelo tratamento com AG. Estes dados sugerem que o NO excedente favorece especialmente o processo de translocação de bactérias que utilizam nitrato como acceptor final de elétrons durante respiração anaeróbica. Mesmo que estes

microrganismos não sejam a causa direta do quadro clínico, contribuem de maneira ativa na manutenção dessa resposta imune e inflamatória observados ao longo deste trabalho. Assim, embora o nitrato derivado da resposta inflamatória não pareça favorecer a expansão da população bacteriana no lúmen intestinal no sistema estudado, ela parece interferir na fisiologia e virulência bacteriana.

Essa premissa é suportada pelo fato de que a utilização de nitrato para o crescimento anaeróbio interfere na produção de indol por parte da linhagem selvagem e dos isolados murinos de *E. coli*. Observamos que os isolados e a *E. coli* HS que cresceram em caldo suplementado com nitrato a 10mM apresentavam baixa produção de indol quando comparados com a condição sem suplementação ou com a *E. coli* mutante incubada nas mesmas condições, demonstrando que a respiração de nitrato poderia influenciar no fenótipo da bactéria. O trabalho de Lai e colaboradores, 2017, mostra que a biossíntese de indol é reprimida durante a respiração anaeróbica de nitrato, especialmente durante o crescimento exponencial. A suplementação com indol exógeno durante a respiração de nitrato leva a elevadas taxas de mutação nas células de *E. coli* sem os genes de bombas de efluxo *mdtEF*, e a superexpressão de genes *tnaAB* (via de produção de indol a partir do triptofano) diminui a aptidão de *E. coli* para esta condição fisiológica. Com esses dados eles sugeriram que a redução da produção de indol poderia estar associada às atividades bioenergéticas de *E. coli* para facilitar sua adaptação e aptidão ao ambiente anaeróbico (Lai et al., 2017). Recentemente foi demonstrado que a exposição de linhagens enteropatogênicas de *E. coli* a indol leva à inibição da expressão de fatores de virulência, como aqueles pertencentes ao sistema de secreção do tipo 3 presentes nessas linhagens (Gorelik et al., 2022), sugerindo que indol interfira na capacidade enteropatogênica dessas linhagens. Assim, podemos propor que a respiração de nitrato parece controlar a virulência em *E. coli* por modular a produção de indol. Novos experimentos devem ser conduzidos para testar essa hipótese e para avaliar o impacto dessa via durante a inflamação intestinal.

## 6 Conclusão

Tanto em seres humanos quanto em modelo experimental, o perfil de IgG anti-microbiota circulante interfere na resposta inflamatória do hospedeiro, levando a alterações da composição da microbiota durante as DII, em parte por favorecer a expansão de determinados grupos bacterianos, incluindo membros da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*. Ainda, a resposta de IgG controla a expressão de NOS2 e a consequente disponibilidade de nitrato, metabólito que parece impactar na virulência de linhagens de *E. coli* capazes de utilizá-lo para a respiração anaeróbia durante a inflamação intestinal.

## 7 Referências

- Adolph, T.E., Meyer, M., Schwärzler, J. et al. (2022). The metabolic nature of inflammatory bowel diseases. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 19, 753–767. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00658-y>
- Agrawal M, Jess T. (2022). Implications of the changing epidemiology of inflammatory bowel disease in a changing world. **United European Gastroenterol J.** 10(10):1113-1120. doi: 10.1002/ueg2.12317
- Amir, M., Ananthanarayanan, A., Zhang, L., Shiland, N., Inohara, N., Nunez, G., & Zeng, M. (2022). Gut microbiota-reactive IgG regulates gut microbiota development and immunity against enteric pathogens in early life. **The Journal of Immunology**, 208(1\_Supplement), 59-04.
- Andoh, A., Sakata, S., Koizumi, Y., Mitsuyama, K., Fujiyama, Y., & Benno, Y. (2007). Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. **Inflammatory bowel diseases**, 13(8), 955-962.
- Armstrong H, Alipour M, Valcheva R, Bording-Jorgensen M, Jovel J, Zaidi D, Shah P, Lou Y, Ebeling C, Mason AL, Lafleur D, Jerasi J, Wong GK, Madsen K, Carroll MW, Huynh HQ, Dieleman LA, Wine E. (2019). Host immunoglobulin G selectively identifies pathobionts in pediatric inflammatory bowel diseases. **Microbiome**, 7(1), 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0604-3>
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915-1920. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bäumler AJ, Sperandio V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**. 7;535(7610):85-93. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature18849>
- Bevins CL; Salzman NH. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nat. Rev. Microbiol.** 9, 356–368. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Bournazos S, Gupta, A, Ravetch JV. (2020). The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. **Nat Rev Immunol**, 20, 633–643. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
- Bournazos S, Ravetch, JV. (2017). Fcγ receptor function and the design of vaccination strategies. **Immunity**, 47, (2), 224-233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.009>
- Bournazos S, Wang TT, Dahan R, Maamary J, Ravetch JV. (2017). Signaling by antibodies: recent progress. **Annu. Rev. Immunol.** 35, 285–311. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052433>
- Bunker JJ, Bendelac A. (2018). IgA responses to microbiota. **Immunity**, 49(2): 211–224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.011>
- Castro-Dopico T, Clatworthy MR. (2019) IgG and Fcγ Receptors in Intestinal Immunity and Inflammation. **Front. Immunol.** DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00805>

Cavalcante, R. M. S., Lima, M. M., Parente, J. M. L., & Nogueira, N. do N. (2020). O papel da microbiota na etiologia das doenças inflamatórias intestinais. **RBONE - Revista Brasileira De Obesidade, Nutrição E Emagrecimento**, 14(86), 498-510. Recuperado de <http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/1278>

Cerutti A, Rescigno M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin a responses. **Immunity**, 28:740–50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.001>

Chistiakov DA, Bobryshev YV, Kozarov E, Sobenin IA, Orekhov AN. (2015). Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. **Front Microbiol**, 13;5:781. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00781>

Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, Gao Z, Mahana D, Raju K, Teitler I, Li H, Alekseyenko AV, Blaser MJ. (2012). Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. **Nature**, 488, 621–626. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11400>

Cisalpino D, Fagundes CT, Brito CB, Ascensão FR, Queiroz-Junior CM, Vieira AT, Sousa LP, Amaral FA, Vieira LQ, Nicoli JR, Teixeira MM, Souza DG. (2017). Microbiota-Induced Antibodies Are Essential for Host Inflammatory Responsiveness to Sterile and Infectious Stimuli. **J Immunol**, 15;198(10):4096-4106. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600852>

Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, Andersen V, ..., Lees CW. (2016). Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. **Lancet**, 9;387(10014):156-67. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00465-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00465-1)

Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, Misra R, Wei B, Eggena ME, Braun J. (2000). Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. **Infection and immunity**, 68(3), 1542-1548.

Daëron M. (2014). Fc receptors as adaptive immunoreceptors. **Curr Top Microbiol Immunol**, 382:131-64. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0_7)

De Brito, C. B., Ascensão, F. R., Arifa, R. D. N., Lima, R. L., Garcia, Z. M., Fagundes, M., ... & Souza, D. G. (2022). FcγRIIb protects from reperfusion injury by controlling antibody and type I IFN-mediated tissue injury and death. **Immunology**, 167(3), 428-442.

Dieterich W, Schink M, Zopf Y. (2018). Microbiota in the Gastrointestinal Tract. **Med Sci (Basel)**, 6(4):116. DOI: <https://doi.org/10.3390/medsci6040116>

Fagundes, M et al. **Papel das imunoglobulinas G no controle e resolução da disbiose intestinal em modelo experimental de colite ulcerativa**. 2021. Tese (Doutorado) - Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2021.

Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M, Pierik M, Joossens S, Dotan N, Norman GL, Altstock RT, Van Steen K, Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. (2007). New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. **Gut**. Oct; 56(10):1394-403. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.2006.108043>.

Gommerman JL, Rojas OL, Fritz JH. (2014). Re-thinking the functions of IgA(+) plasma cells. **Gut Microbes**, 5:652–62. DOI: <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969977>

Gorelik, O., Rogad, A., Holoidovsky, L., Meijler, M. M., & Sal-Man, N. (2022). Indole intercepts the communication between enteropathogenic *E. coli* and *Vibrio cholerae*. **Gut Microbes**, 14(1), 2138677. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2138677>

Gregory D, Chaudet H, Lagier JC, Raoult D. (2018). How mass spectrometric approaches applied to bacterial identification have revolutionized the study of human gut microbiota. **Expert Review of Proteomics**, 15:217–229. DOI: <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1429271>

Guan, Q. (2019). A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Journal of immunology research**, 2019.

Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ. (2017). Human genetic variation and the gut microbiome in disease. **Nat. Rev. Genet.**, 18 (11), 690-699. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.63>

Hand TW, Dos Santos LM, Bouladoux N, Molloy MJ, Pagán AJ, Pepper M, Maynard CL, Elson CO 3rd, Belkaid Y. (2012). Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. **Science**, 337(6101):1553-6. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1220961>

Harley IT, Karp CL. Obesity and the gut microbiome: Striving for causality. **Mol Metab.** 2012 Aug 3;1(1-2):21-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.07.002>.

Harmsen HJ, Pouwels SD, Funke A, Bos NA, Dijkstra G. (2012). Crohn's disease patients have more IgG-binding fecal bacteria than controls. **Clin Vaccine Immunol**, 19:515–21. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.05517-11>

Ijssennagger N, Belzer C, Hooiveld GJ, Dekker J, van Mil SW, Müller M, Kleerebezem M, van der Meer R. (2015). Gut microbiota facilitates dietary heme- induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 112, 10038–10043. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1507645112>

Jarmakiewicz-Czaja S, Zielińska M, Sokal A, Filip R. (2022). Genetic and Epigenetic Etiology of Inflammatory Bowel Disease: An Update. **Genes (Basel)**. Dec 16;13(12):2388. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13122388>.

Kamalian A, Sohrabi Asl M, Dolatshahi M, Afshari K, Shamshiri S, Momeni Roudsari N, Momtaz S, Rahimi R, Abdollahi M, Abdolghaffari AH. (2020). Interventions of natural and synthetic agents in inflammatory bowel disease, modulation of nitric oxide pathways. **World J Gastroenterol**, 26(24): 3365-3400. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i24.3365>

Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*, v. 45, n. D1, p. D353-D361. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>

Kim DH, Cheon JH. (2017). Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. **Immune Netw.** Feb;17(1):25-40. DOI: <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.25>.

Lach, G., Schellekens, H., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). Anxiety, Depression, and the Microbiome: A Role for Gut Peptides. **Neurotherapeutics**, 15(1), 36–59. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0585-0>

- Lai Y, Xu Z, Yan A. (2017). A novel regulatory circuit to control indole biosynthesis protects *Escherichia coli* from nitrosative damages during the anaerobic respiration of nitrate. **Environ Microbiol**. 19(2):598-610. DOI: 10.1111/1462-2920.13527.
- Lee M; Chang EB. (2021). Inflammatory bowel diseases (IBD) and the microbiome—searching the crime scene for clues. **Gastroenterology**, 160(2), 524-537.
- Litvak Y, Byndloss MX, Tsolis RM, Bäumler AJ. (2017). Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction. **Curr Opin Microbiol**, 39:1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.07.003>
- Ljung T, Lundberg S, Varsanyi M, Johansson C, Schmidt PT, Herulf M, Lundberg JO, Hellstrom PM. (2006). Rectal nitric oxide as biomarker in treatment of inflammatory bowel disease: Responders versus nonresponders. **World J Gastroenterol**, 12(21):3386–3392. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i21.3386>
- Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW, ..., Huttenhower C. (2019). Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. **Nature**, v. 569, n. 7758, p. 655-662, 2019.
- Lodes, M. J., Cong, Y., Elson, C. O., Mohamath, R., Landers, C. J., Targan, S. R., ... & Hershberg, R. M. (2004). Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. **The Journal of clinical investigation**, 113(9), 1296-1306.
- Love Mi, Huber W, Anders S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 1-21. DOI: <https://doi.org/0.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu J, Ellsworth JL, Hamacher N, Oak SW, Sun PD. (2011). Crystal structure of Fc $\gamma$  receptor I and its implication in high affinity  $\gamma$ -immunoglobulin binding. **Journal of Biological Chemistry**, 286 (47), 40608-40613. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257550>
- Luu M, Steinhoff U, Visekruna A. (2017). Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. **Clin Transl Immunology**. 6(9):e156. DOI: <https://doi.org/10.1038/cti.2017.39>.
- Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, Shah N, Wang C, Magrini V, Wilson RK, Cantarel BL, Coutinho PM, Henrissat B, Crock LW, Russell A, Verberkmoes NC, Hettich RL, Gordon JI. (2009). Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. **Proc Natl Acad Sci USA**, 106(14):5859-64. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0901529106>
- Manuzak J, Dillon S., Wilson C. (2012). Differential interleukin-10 (IL-10) and IL-23 production by human blood monocytes and dendritic cells in response to commensal enteric bacteria. **Clin. Vaccine Immunol**, 19 : 1207–1217. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00282-12>.
- Massicotte-Azarniouch D, Herrera CA, Jennette JC, Falk RJ, Free ME. (2022). Mecanismos de dano vascular na vasculite ANCA. **Semin Immunopathol** 44 , 325–345. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00920-0>
- Masuda A, Yoshida M, Shiomi H, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, Mizuno S, Nakamura A, Takai T, Blumberg RS, Azuma T. (2009). Role of Fc Receptors as a therapeutic target.

**Inflamm Allergy Drug Targets**, 8 (1),80-86. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152809787582525>

McAleer JP, Kolls JK. (2018). Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. **Eur. J. Immunol**, 48, 39–49. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201646721>

McMurdie PJ, Holmes S (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE** 8(4): e61217. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Mirkov, MU, Verstockt, B., & Cleynen, I. (2017). Genética da doença inflamatória intestinal: além do NOD2. **The lancet Gastroenterology & hepatology** , 2 (3), 224-234. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30111-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30111-X)

Moens E, Veldhoen M. (2012). Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours. **Immunology**, 135(1):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03506.x>

Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H. et al. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome Biol** 13, R79 . <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>

Mota IB, Faria A, Pimentel-Santos FM, Calhau C. (2018). Microbiota intestinal e espondiloartrites: o papel da dieta na terapêutica. **Acta Portuguesa de Nutrição**, 14, 24-28. DOI: <https://doi.org/10.21011/apn.2017.1405>

Nagao-Kitamoto H, Kamada N. (2017). Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease. **Immune Netw**. 17(1):1-12. DOI: <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.1>

Negi S, Das DK, Pahari S, Nadeem S, Agrewala JN. (2019a). Potential role of gut microbiota in induction and regulation of innate immune memory. **Frontiers in immunology**, 10, 2441. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02441>

Negi S, Pahari S, Bashir H, Agrewala JN. (2019b). Gut Microbiota Regulates Mincle Mediated Activation of Lung Dendritic Cells to Protect Against Mycobacterium tuberculosis. **Front Immunol**, 10, 1142. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01142>.

Nimmerjahn F., Ravetch, J. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nat Rev Immunol**, 8, 34–47. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri2206>

Palatka K, Serfozo Z, Vereb Z, Hargitay Z, Lontay B, Erdodi F, Ban-falvi G, Nemes Z, Udvardy M, Altorjay I. (2005). Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric oxide syn-thase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, 40(6):670–80. DOI: <https://doi.org/10.1080/00365520510015539>

Papp M, Norman GL, Altorjay I, Lakatos PL. (2007). Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? **World J Gastroenterol**. Apr 14;13(14):2028-36. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i14.2028>.

Park SC, Jeon YT. (2019). Genetic Studies of Inflammatory Bowel Disease-Focusing on Asian Patients. **Cells**. May 1;8(5):404. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8050404>.

- Passos MDCF, Moraes-Filho JP. (2017). Intestinal microbiota in digestive diseases. **Arq Gastroenterol**, 54(3):255-262. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.201700000-31>
- Pickard J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., & Nunez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. **Immunological Reviews**, 279(1), 70–89. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12567>
- Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. (2013). Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. **Inflamm Bowel Dis**, 19(3):481-8. DOI: <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e31827fec6d>
- Reinhardt C, Bergental M, Greiner TU, Schaffner F, Ostergren-Lundén G, Petersen LC, Ruf W, Bäckhed F. (2012). Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. **Nature**, 483(7391), 627-31. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10893>.
- Rengarajan S, Vivio EE, Parkes M, Peterson DA, Roberson EDO, Newberry RD, Ciorba MA, Hsieh CS. (2019). Dynamic immunoglobulin responses to gut bacteria during inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, 11, 1–16. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1626683>
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. 7, p. e47-e47. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rutten NB, Rijkers GT, Meijssen CB, Crijns CE, Oudshoorn JH, van der Ent CK, Vlieger AM. (2015). Intestinal microbiota composition after antibiotic treatment in early life: the INCA study. **BMC Pediatr**, 15: 204. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12887-015-0519-0>
- Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, Xavier RJ. (2019). Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. **Nat Rev Microbiol**, 17(8):497-511. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-6>
- Sitaraman SV, Klapproth JM, Moore DA 3rd, Landers C, Targan S, Williams IR, Gewirtz AT. (2005). Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, p. G403-G406. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00357.2004>
- Shin NR, Whon TW, Bae JW. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends Biotechnol**, 33(9):496-503. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Smith KG, Kamdar AA, Stark JM. (2019). Lung defenses: Intrinsic, innate, and adaptive. HUMORAL IMMUNITY: Immunoglobulin G. In: Kendig's disorders of the respiratory tract in children. **Elsevier**, p. 131. e2. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44887-1.00008-0>
- Sommer F, Bäckhed F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. **Nat Rev Microbiol**, 11(4):227-238. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Sonnenburg Ed, Sonnenburg JL. (2019). The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. **Nature Reviews Microbiology**, 17(6):383-390 DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0191-8>

- Soufli I, Toumi R, Rafa H, Touil-Boukoffa C. (2016). Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**.7:353-360. DOI: <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i3.353>
- Targan, S. R., Landers, C. J., Yang, H., Lodes, M. J., Cong, Y., Papadakis, K. A., ... & Hershberg, R. M. (2005). Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. **Gastroenterology**, 128(7), 2020-2028. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.046>
- Thomson C. A. (2016). IgG Structure and Function. **Encyclopedia of Immunobiology**, 15–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374279-7.05002-5>
- Thursby E, Juge N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, 474(11):1823-1836. DOI: <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tortora GJ, Funke Br., Case Cl. (2017). **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 473-478.
- Tungland B. (2018). **Human Microbiota in Health and Disease**. Chapter 1.1 Commensal gut microbiota composition and body distribution, p. 1-5
- Unkeless JC, Shen Z, Lin CW, DeBeus E. (1995). Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIB. **Semin Immunol.**, 7(1):37-44. doi: [https://doi.org/10.1016/1044-5323\(95\)90006-3](https://doi.org/10.1016/1044-5323(95)90006-3).
- Wang Yu; Jönsson, Friederike. (2019). Expression, role, and regulation of neutrophil Fcγ receptors. **Frontiers in immunology**, 10, 1958. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01958>
- Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Thiennimitr P, Poon V, Kestra AM, Laughlin RC, Gomez G, Wu J, Lawhon SD, Popova IE, Parikh SJ, Adams LG, Tsolis RM, Stewart VJ, Bäumlér AJ. (2013). Host-derived nitrate boosts growth of E. coli in the inflamed gut. **Science**, 339(6120):708-11. DOI:
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**. 2007 Jul 26;448(7152):427-34. doi: 10.1038/nature06005. PMID: 17653185.
- Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY. (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. **Cell**, 161, 264–276. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
- Zeng MY, Cisalpino D, Varadarajan S, Hellman J, Warren HS, Cascalho M, Inohara N. Núñez G. (2016). Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. **Immunity**, 44: 647-658. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.006>
- Zhang, Y., Xiao, M., Horiyama, T., Zhang, Y., Li, X., Nishino, K., & Yan, A. (2011). The multidrug efflux pump MdtEF protects against nitrosative damage during the anaerobic respiration in Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**, 286(30), 26576-26584.

Zhang D, Li S, Wang N, Tan HY, Zhang Z, Feng Y. (2020) The cross-talk between gut microbiota and lungs in common lung diseases. **Front. Microbiol.**, 11, 1-14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00301>

Zhang D, Frenette PS. (2019). Cross talk between neutrophils and the microbiota. **Blood**, 133(20):2168-2177. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844555>

Zheng D, Liwinski T, Elinav E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, 30(6), 492–506. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

Zhou MJ, Brown EJ. (1994). CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. **J Cell Biol.**, 125(6):1407-16. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.125.6.1407>.

Zhou M, He J, Shen Y, Zhang C, Wang J, Chen Y. (2017). New Frontiers in Genetics, Gut Microbiota, and Immunity: A Rosetta Stone for the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **Biomed Res Int.** ;2017:8201672. doi: 10.1155/2017/8201672.