

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: O papel do receptor ST2 no controle
inicial da infecção oral por *Brucella abortus*

ORIENTADO: RAIANY ARAUJO SANTOS

ORIENTADORES: SERGIO COSTA OLIVEIRA E ANGELICA THOMAZ
VIEIRA

BELO HORIZONTE

Julho – 2019

RAIANY ARAUJO SANTOS

**O PAPEL DO RECEPTOR ST2 NO CONTROLE INICAL DA INFECÇÃO ORAL POR
BRUCELLA ABORTUS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadores:

Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira

(Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Prof. Dra. Angélica Thomáz Vieira

(Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Belo Horizonte – MG

2019

043

Santos, Raiany Araujo.

O papel do receptor ST2 no controle inicial da infecção oral por *Brucella Abortus* [manuscrito] / Raiany Araujo Santos. – 2019.

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

Orientadores: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira. Prof. Dra. Angélica Thomáz Vieira.

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

1. Genética. 2. Mucosa Intestinal. 3. Microbioma Gastrointestinal. 4. Infecção. 5. Receptor 1 Toll-Like. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Vieira, Angélica Thomáz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências. Biológicas. IV. Título

CDU: 575



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Raiany Araujo Santos

288/2019

entrada

2º/2017

CPF:

110.421.266-82

Às quatorze horas do dia **30 de julho de 2019**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**O papel do receptor ST2 no controle inicial da infecção oral por Brucella abortus**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Sergio Costa Oliveira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para 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. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Sergio Costa Oliveira	UFMG	327-651855-49	APROVADO
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	283.141.225-49	APROVADA
Izabela Galvão	UFMG	082.628.326-80	Aprovada
Angelica Thomaz Vieira	UFMG	057338 35613	Aprovada

Pelas indicações, 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.

Belo Horizonte, 30 de julho de 2019.

Sergio Costa Oliveira - Orientador

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Izabela Galvão

Angelica Thomaz Vieira

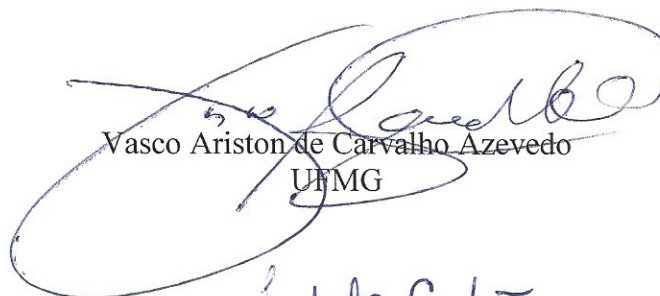


"O papel do receptor ST2 no controle inicial da infecção oral por *Brucella abortus*"

Raiany Araujo Santos

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Sergio Costa Oliveira - Orientador
UFMG


Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
UFMG


Izabela Galvão
UFMG


Angelica Thomaz Vieira
UFMG

Belo Horizonte, 30 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que ele me concedeu nesses 2 anos de mestrado. O seu cuidado foi sempre visível para comigo. Agradeço pelas portas abertas ao longo da minha vida e por me dar forças para prosseguir nesta caminhada.

A minha família, principalmente meus pais, por sempre acreditarem em mim em toda a minha caminhada. Agradeço por todo esforço e amor, que me proporcionaram chegar até aqui. Nada disso se tornaria realidade sem o amor e o cuidado de vocês. Amo vocês!

Ao professor Sergio Costa, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e executar esse trabalho. Obrigada pela orientação, confiança, autonomia e pela oportunidade de crescimento acadêmico e por todo conhecimento adquirido.

A professora Angélica Thomaz, por ser uma co-orientadora sempre presente, por me acolher tão bem no seu grupo de pesquisa. Agradeço muito por toda dedicação, orientação, conversas, conselhos, pela convivência e parceria durante estes 2 anos de trabalho.

Aos amigos e parceiros de equipe, David, Vitor, Marcela, Gabi, Vivi e Pri que contribuíram para que esse trabalho se estabelecesse e chegasse ao fim com sucesso. Agradeço por toda parceria e amizade que se estendeu das paredes dos laboratórios para a vida.

A Sandra, por toda dedicação, profissionalismo, amizade e acolhimento. Aos amigos do LIDI pela agradável convivência e companheirismo, e aos bioteristas por todo cuidado com os animais.

As agências financiadoras, Departamento de Genética e a UFMG.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A BRUCELOSE	12
1.2 PATOGÊNESE	12
1.3 INFECÇÃO ORAL PELA BRUCELLA ABORTUS	14
1.4. IMUNIDADE INTESTINAL	16
1.4.1 A MICROBIOTA	16
1.4.2 O MUCO	17
1.4.3 O EPITÉLIO INTESTINAL	19
1.4.4 LÂMINA PRÓPRIA	19
1.5 RECEPTOR ST2	21
1.5.1 O EIXO ST2/IL-33 NA IMUNIDADE INTESTINAL	25
1.6 JUSTIFICATIVA	27
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	29
3.2 BACTÉRIA, CONDIÇÕES DE CULTIVO E INFECÇÃO <i>IN VIVO</i> DOS ANIMAIS	29
3.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (CFU)	29
3.4 ENSAIO DE PERMEABILIDADE INTESTINAL <i>IN VIVO</i>	30
3.5 MEDIDA DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	30
3.6 MEDIDA DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO)	31
3.7 DOSAGEM DE CITOCINAS	31
3.8 ANÁLISE DO PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL	32
3.9 qPCR EM TEMPO REAL: EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA	32
3.9.1 DESENHO DOS PRIMERS	33
3.9.2 REAÇÃO DE qPCR EM TEMPO REAL	33
3.9.3 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS DE qPCR EM TEMPO REAL	33

3.10 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES	34
3.11 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS	34
3.12 DERIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDMS)	34
3.13 ENSAIO DE MEDIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	34
3.14 CITOMETRIA DE FLUXO	35
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i> à infecção oral por <i>Brucella abortus</i> em camundongos WT versus ST2 ^{-/-}	37
4.2 Avaliação da integridade da barreira epitelial intestinal e de mediadores intestinais em animais WT e ST2 ^{-/-} antes e após a infecção por via oral por <i>B. abortus</i>	38
4.3 Avaliação da expressão dos transcritos de MUC1 e MUC2 antes e após a infecção por via oral por <i>Brucella abortus</i> em animais WT e ST2 ^{-/-}	40
4.4 Avaliação do perfil da microbiota intestinal em animais WT e ST2 ^{-/-} antes e após a infecção por via oral por <i>B. abortus</i>	431,42
4.5 Avaliação do perfil celular intestinal antes e após a infecção por via oral por <i>B.abortus</i> em animais WT e ST2 ^{-/-}	42,403
4.6 Avaliação da produção de citocinas no tecido intestinal de animais WT e ST2 ^{-/-} antes e após a infecção por via oral por <i>B. abortus</i>	40
4.7 Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i> e do perfil celular após infecção sistêmica por <i>Brucella abortus</i> em camundongos WT versus ST2 ^{-/-}	44
4.8 Avaliação da produção de citocinas e da população de células T regulatórias em cultura de esplenócitos em animais WT e ST2 ^{-/-} antes e após a infecção sistêmica por <i>B. abortus</i>	45
4.9 Avaliação da capacidade microbicida de BMDM de animais WT e ST2 ^{-/-}	47
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	55
7. MODELO	55
8. REFERÊNCIAS	57
9. ANEXOS.....	70

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: Representação esquemática das barreiras intestinais.....	20
FIGURA 2: Isoformas do receptor ST2	21
TABELA 1: Expressão de ST2 e sST2 e sua regulação em células imunes.....	23
TABELA 2: Sequências dos iniciadores utilizado na realização da curva de diluição e na quantificação relativa por PCR em tempo real.....	32
FIGURA 3 : Contagem de CFU no fígado, baço e linfonodos mesentéricos em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados por via oral por <i>Brucella abortus</i>	35
FIGURA 4: Permeabilidade intestinal em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados por via oral por <i>Brucella abortus</i>	36
FIGURA 5: Expressão de transcritos de Anfirregulina (AREG) em intestino delgado de camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados por via oral por <i>Brucella abortus</i>	37
FIGURA 6: Produção de citocinas no tecido intestinal de camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados por via oral por <i>Brucella abortus</i>	37
FIGURA 7: Expressão de transcritos de MUCINA 2 (MUC2) em intestino delgado de camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados por via oral por <i>Brucella abortus</i>	40
FIGURA 8: Perfil da microbiota intestinal qualitativo (A) e quantitativo (B) cultivável de camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados por via oral por <i>Brucella abortus</i>	41,42
FIGURA 9: Perfil celular intestinal em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados por via oral por <i>Brucella abortus</i>	43
FIGURA 10: Produção de citocinas no intestino delgado em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados por via oral por <i>Brucella abortus</i>	44
FIGURA 11: Contagem de CFU no fígado, baço e linfonodos mesentéricos e contagem total de leucócitos circulantes em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e infectados sistemicamente por <i>Brucella abortus</i>	45
FIGURA 12: Produção de citocinas e avaliação da população de células T regulatórias e TCD4 ⁺ e CD8 ⁺ em cultura de esplenócitos em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} infectados sistemicamente por <i>Brucella abortus</i>	46
FIGURA 13: Produção de Oxido Nitrico em macrófagos derivados da medula óssea em camundongos WT versus ST2 ^{-/-}	47

FIGURA 14: Modelo da resposta à infecção oral por <i>B. abortus</i> em animais WT versus ST2 ^{-/-}	56
FIGURA 15: Contagem de CFU no fígado, baço e linfonodos mesentéricos em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais não infectados e após 14 dias de infecção por via oral por <i>Brucella abortus</i>	70
FIGURA 16: Contagem de CFU nos linfonodos mesentérico em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais infectados após 14 dias de infecção por via sistêmica por <i>Brucella abortus</i>	70
FIGURA 17: Perfil celular intestinal em camundongos WT versus ST2 ^{-/-} , em animais após 14 dias de infecção por via oral por <i>Brucella abortus</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S – 18S rRNA

AMP - Peptídeos Antimicrobianos

AREG - Fator de Crescimento Anfirregulina

Ba – Brucella abortus

BB - Brucella Broth

BHI - Agar Brain Heart Infusion

BMDM - Macrófagos Derivados da Medula Óssea

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO₂ – Dióxido de Carbono

ConA - Concanavalina A

DC - Dendritic Cells

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dpi – Dias pós infecção

EDTA - *EthyleneDiamineTetracetic acid*

EGF - Fatores de Crescimento Epidérmico

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

EPO - Peroxidase Eosinofílica

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

H&E – Hematoxilina e Eosina

HTAB - Brometo de Hexadeciltrimetilamônio

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IELs - Linfócitos Intraepiteliais

IFN-γ – Interferon gama

IL-1 – Interleucina 1

IL-13 – Interleucina 13

IL-23 – Interleucina 23

IL-33 - Interleucina 33

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-9 – Interleucina 9

ILC2 - Células Inatas Auxiliares do Grupo 2

kDa - Kilodalton
LNM – Linfonodo Mesenterico
LPS – Lipopolissacarídeo
MAC - Agar MacConkey
MPO - Mieloperoxidase
MRS - Lactobacilli MRS Broth
MUC - Mucina
MΦ - Macrófagos Derivados da Medula Óssea
NaCl - Cloreto de Sódio
NF-kB - Fator Nuclear Kappa B
NK – Natural Killer
nm - Nanômetro
NO - Oxido Nítrico
OPD - O-fenilenodiamina
PBS – Phosphate Buffered Saline
PRR - Receptor de Reconhecimento de Patogenos
qPCR – Polimerase chain reaction quantitative real time
rpm – Rotações por minuto
S. aureus - Staphylococcus aureus
SFB - Soro Fetal Bovino
SIGIRR – Single Ig IL-1 Related Receptor
ST2 – Supressor da Tumorigenicidade 2, Estimulação do Crescimento Expresso no Gene 2, Estimulação Sérica 2
TCR – Receptor de células T
TGI – Trato Gastrointestinal
TH1 – T helper 1
TH2 - Células T Auxiliares Helper do Tipo 2
TMB - Tetramethylbenzidine
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TRAF6 - Fator 6 Associado ao Receptor TNF
Treg - Células T Regulatórias
UFC - Unidades Formadoras de Colônias
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
WT – Wild Type
μl - Microlitros
μm - Micrometro

RESUMO

O receptor ST2, um membro da superfamília de receptores Toll-like/IL-1, é expresso em várias células do sistema imune. A citocina IL-33 se liga ao receptor ST2, que por sua vez desempenha importantes funções no intestino, como regeneração do epitélio e interação com o microbioma, promovendo homeostase intestinal. O eixo ST2/IL-33 apesar de amplamente estudado no contexto de infecções virais, tem o seu papel nas infecções bacterianas ainda pouco explorado. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos no processo de invasão e estabelecimento da infecção por *Brucella abortus* (Ba) por via oral, explorando o papel do receptor ST2 na microbiota intestinal bem como na homeostase intestinal. Para isso, animais selvagens Balb/c (WT) e deficientes para ST2 (ST2^{-/-}) foram infectados por gavagem com *B.abortus* e eutanasiados aos 3 e 14 dias após-infecção (dpi). Os resultados sugerem que animais ST2^{-/-} são mais resistentes a infecção oral, apresentando redução da carga bacteriana no fígado e baço, sendo a *B. abortus* retida em linfonodos mesentéricos (LNM) quando comparados aos animais WT. Entretanto, esse fenotipo não foi observado quando a infecção se deu por via intraperitoneal, sugerindo que o ST2 seja importante na fase de invasão da *B.abortus* através da mucosa intestinal. Além disso, a infecção por Ba induziu a permeabilidade intestinal nos animais WT mas não nos animais ST2^{-/-}. Foi observado uma menor quantidade e diversidade de grupos bacterianos presentes na microbiota intestinal, de camundongos ST2^{-/-} quando comparados aos animais WT infectados, além de alterações significativas na composição da microbiota intestinal durante a infecção em ambos os grupos de animais, sugerindo um quadro de disbiose, e portanto, participação da microbiota intestinal no contexto do processo infeccioso por *B. abortus*. A infecção levou a um aumento do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos no intestino de camundongos WT infectados, um fenômeno não observado em camundongos ST2^{-/-} infectados. As análises de MUC2 revelam o aumento da expressão desta molécula somente no intestino delgado dos animais WT, sugerindo que o ST2 possa participar da regulação desta molécula. Por outro lado, a infecção por Ba pela via oral levou a um aumento da produção das citocinas pro-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-6 em animais ST2^{-/-} quando comparados aos animais WT, o que pode estar relacionado a um perfil mais resistente à infecção observado nos animais nocautes. Nossos resultados sugerem, até o momento, um papel do receptor ST2 na homeostase intestinal impactando no processo de invasão da *Brucella abortus* pela mucosa intestinal e consequentemente, disseminação sistêmica após a rota da infecção oral.

Palavras chaves: Receptor ST2, microbiota, infecção, mucosa intestinal

ABSTRACT

The ST2 receptor, a member of Toll-like/IL-1 receptor superfamily, is expressed in several immune cells. This receptor binds to the cytokine IL-33, that plays important functions in the gut, such as, epithelium regeneration, interaction with the microbiome, promoting intestinal homeostasis. The ST2/IL-33 axis although widely studied in the context of viral infections, its role in bacterial infections is still poorly explored. Therefore, the main goal of this study was to investigate the mechanisms involved in the process of invasion and establishment of *Brucella abortus* (Ba) infection orally, exploring the role of the ST2 receptor in the intestinal microbiota and homeostasis. For this, wild-type animals Balb/c (WT) and ST2 deficient mice (ST2^{-/-}) were infected by gavage with *B. abortus* and euthanized 3 and 14 days after infection (dpi). The results suggest that ST2^{-/-} animals are more resistant to oral infection compared to WT mice, showing reduction of bacterial load in livers and spleens, with *B. abortus* been retained in mesenteric lymph nodes (LNM). However, this phenotype was not observed when the infection occurred via intraperitoneal route, suggesting that ST2 is important in the invasion phase of *B. abortus* through the intestinal mucosa. Furthermore, Ba infection induced intestinal permeability in WT mice but not in ST2^{-/-} animals. Additionally, it was observed a lower quantity and diversity of bacterial groups present in the intestinal microbiota of ST2^{-/-} mice when compared to WT infected animals. However, significant alterations in the composition of the intestinal microbiota was observed during infection in both animal groups, suggesting a dysbiosis phenotype; and therefore, the involvement of intestinal microbiota in the context of *B. abortus* infection. The infection led to an increase in the recruitment of neutrophils and eosinophils in the intestine of WT mice infected with *B. abortus*, a phenomena not observed in ST2^{-/-} infected-mice. The MUC2 analysis also revealed the increase in the expression of this molecule only in the small intestine of the WT mice, suggesting that the ST2 can participate in the regulation of this molecule. On the other hand, oral infection with Ba induced higher levels of IFN- γ , TNF- α and IL-6 in ST2^{-/-} mice compared to WT animals, suggesting this pro-inflammatory profile detected in the knockout mice might be related to the increased resistance observed in these animals. Our results suggest, so far, a role for ST2 receptor in the intestinal homeostasis impacting the process of *Brucella abortus* invasion by the intestinal mucosa and consequently, systemic dissemination after infection by the oral route.

Keywords: ST2 receptor, microbiota, infection, intestinal mucosa

1. INTRODUÇÃO

1.1. A BRUCELOSE

A brucelose é uma doença crônica causada pela bactéria do gênero *Brucella* que pertence ao subgrupo α -2 de Proteobactérias. Os indivíduos infectados apresentam sintomas inespecíficos compartilhados com diversas doenças, isso faz com que a brucelose humana apresente dados subestimados de distribuição epidemiológica (WHO, 2006), contudo essa enfermidade acomete cerca de 500.000 indivíduos anualmente. Em seres humanos os principais sintomas da fase aguda da doença são febre ondulante, dores de cabeça, fadiga, mialgia e perda de peso. Na fase crônica, pode ser observada endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas (Solera, 2010).

O gênero *Brucella* é caracterizado como cocobacilos gram-negativos, imóveis, que não esporulam e não encapsulam. São parasitas intracelulares facultativos e possuem membrana celular externa composta principalmente de lipopolissacarídeo (LPS), considerado um dos principais fatores de virulência desse gênero (Corbel and Morgan, 1984; Martin and Hancock, 1990).

As três espécies que apresentam maior risco de infecção para humanos são: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis*. Apesar de *B. melitensis* ser a mais patogênica, *B. abortus* é a principal fonte de infecção, por ser a espécie mais difundida no mundo (Corbel, 1997). A infecção natural por *Brucella* ocorre principalmente pelas vias orais e nasais através de: consumo de leite cru e produtos lácteos sem pasteurização provenientes de animais infectados (nesse caso a *B. abortus* pode sobreviver de duas semanas até seis meses), ingestão de carne (menos comum em países onde a ingestão de carne crua não é habitual), inalação de aerossóis contendo o patógeno, contato com animais infectados e suas secreções (principalmente com material de aborto), e pelo hábito dos bovinos de lamber e cheirar animais recém-nascidos ou mesmo fetos abortados (Paraná, 2015; Seleem et al., 2010; Silva et al., 2005).

1.2 PATOGÊNESE

A brucelose é uma doença sistêmica na qual qualquer órgão ou tecido do organismo pode estar envolvido. Nos animais a brucelose é uma infecção crônica, que pode persistir por toda a vida do hospedeiro. Nas fêmeas, *Brucella* possui tropismo pelo hormônio placentário bovino, o eritritol, levando a lesões nas glândulas uterinas enquanto que, nos machos, a

bactéria possui tropismo por hormônios masculinos, como a testosterona, dirigindo-se aos testículos. Assim, a infecção por *Brucella* afeta principalmente os órgãos reprodutivos causando aborto e infertilidade (Young, 1988).

A habilidade de *Brucella* causar doença requer alguns passos críticos durante a infecção. A patogênese causada pela infecção por *Brucella* está associada à sua capacidade de evitar mecanismos de defesa do hospedeiro, resultando na sua proliferação intracelular (Sangari and Aguero, 1996).

Vários mecanismos de virulência já foram verificados no gênero *Brucella*, dentre eles: o sistema de secreção do tipo IV (SST4) — importante para sobrevivência e replicação intracelular da *Brucella* (Hong et al., 2000) —; o sistema regulatório de dois componentes BvrR/BvrS—essencial para que a bactéria mude do meio extracelular para o ambiente intracelular (Guzman-Verri et al., 2002) —; o sistema transportador do tipo ABC — constituído por proteínas que fazem o transporte transmembrana de peptídeos, poliaminas, íons, aminoácidos, ferro e sulfatos para o interior da bactéria e exportam antibióticos, ácidos graxos e toxinas da mesma (Tam and Saier JR, 1993)—; o LPS (lipopolissacarídeo) — que possui baixa toxicidade para os macrófagos, baixa pirogenicidade e baixa atividade ferropênica—; os β -1,2 glucanos cíclicos —diretamente relacionado ao tráfego intracelular; atividade de catalase e urease —; além de determinados genes (*pgm*, *rfbE*, *pmm* e *whoA*, relacionados a síntese de LPS; *cydB*, atividade citocromo oxidase; *ahpC* e *ahpD*, proteínas contra danos dos radicais de oxigênio; *purE*, síntese de purinas) entre outros (Ko and Splitter, 2003; Seleem et al., 2010).

Após a internalização ocorre a formação de vacúolos contendo *Brucella*, denominados BCVs (*Brucella containing vacuole*). Tal vacúolo entra em processo de maturação, no qual sofre acidificação (Porte et al., 1999), o que constitui um sinal para a indução da expressão dos genes *virB* da bactéria (Boschiroli et al., 2002). Esses genes codificam o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) que tem sido apontado como um fator de virulência essencial para a resistência e replicação das bactérias do gênero *Brucella* (Celli, 2006). O T4SS *virB* contribui para a sobrevivência do patógeno alterando o tráfego intracelular e possibilitando a formação do nicho replicativo (de Jong et al., 2008). Apenas 15 a 30% das bactérias internalizadas conseguem evitar a fusão com lisossomos e redirecionar sua trajetória para atingir o estágio replicativo (Gorvel and Moreno, 2002).

Após sofrer a acidificação, o BCV interage com a via endocítica e adquire uma glicoproteína de membrana, LAMP-1, marcadora de endossomos tardios tornando-se um vacúolo intermediário (Celli et al., 2003; Starr et al., 2008). Entretanto, mais tardiamente a bactéria consegue promover a perda deste marcador evitando assim a fusão do vacúolo com o lisossomo. A partir deste momento, o BCV mantém contato com o retículo endoplasmático (RE) de maneira dependente de T4SS *virB* e adquire marcadores específicos do RE em sua superfície, formando finalmente a organela replicativa da *Brucella* (Celli et al., 2003).

Outra maneira que as bactérias do gênero *Brucella* possuem para evadir o sistema de defesa do hospedeiro é através da produção de moléculas modificadas que são fracamente reconhecidas pelos receptores do hospedeiro (de Jong et al., 2008). O seu LPS não convencional, por exemplo, possui no lipídeo A (uma das três partes que compõem o LPS) resíduos de ácidos graxos muito mais longos do que o LPS de enterobactérias. Essa modificação torna o LPS da *Brucella* fracamente reconhecido pelos receptores de superfície celular da imunidade inata (Lapaque et al., 2005) e, também, o transforma em um alvo fraco de ligação para o componente C3 do sistema do complemento (Barquero-Calvo et al., 2007).

Os mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro tornam-se a principal base para o estabelecimento da infecção crônica. E, como resposta do organismo à persistência da bactéria no tecido, ocorre à formação de granulomas, que podem ser encontrados no fígado e também em outros órgãos com intuito de restringir o crescimento bacteriano (Grilló et al., 2012; Hunt and Bothwell, 1967).

1.3 INFECÇÃO ORAL PELA *BRUCELLA ABORTUS*

Numa infecção natural pela *Brucella*, o tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal GALT, como a placa de Peyer (PPs), serve como sentinela para reconhecimento e iniciação das respostas imunes contra essas bactérias. Pelo fato do GALT não possuir ductos linfáticos aferentes, é necessário que a apresentação de antígenos luminiais ocorra através do epitélio da mucosa. O lado luminal dos folículos linfóides do GALT é coberto pelo epitélio associado ao folículo em forma de cúpula (FAE), dentro do qual estão as células M (Neutra et al., 2001).

Dessa forma, já foi demonstrado que a invasão da *Brucella* no trato gastrointestinal esta associada a sua capacidade de se translocar mais efetivamente via células M do que através de enterócitos (Paixao et al., 2009). Diversos agentes infecciosos usam proteínas

ancoradas a GPI (receptores ancorados ao glicosilfosfatidilinositol) para conseguirem infectar as células do hospedeiro. A proteína priônica celular PrP^c, é uma proteína ancorada a GPI altamente expressa na superfície apical das células M entre as células epiteliais intestinais. A *Brucella* consegue infectar as células M após a interação da bactéria com a proteína PrP^c (Nakato et al., 2012), sendo a sua translocação realizada pelo processo de transcitose, não ocorrendo ruptura das junções célula-célula (Paixão et al., 2009). Além disso, foi demonstrado um papel importante de PrP^c interagindo com a proteína de choque térmico expressa pela *B.abortus* Hsp60, onde esta interação facilita a formação de macropinosomas e subsequente replicação intracelular da *B.abortus* dentro de macrófagos. Esta interação também pode estar participando da invasão da *Brucella* às células M.

Além das células M, as células dendríticas (DCs) são outro alvo celular da *B.abortus*. Salcedo e colaboradores (2008) demonstraram que *Brucella* foi capaz de estabelecer um nicho de replicação dentro de células dendríticas cultivadas *in vitro*, retardando o processo de maturação destas células, resultando na redução de secreção de citocinas e na apresentação de antígenos de forma eficiente. Além disso, a sua replicação é dependente do seu sistema de secreção tipo IV virB, necessário para evitar a via de degradação lisossomal, similar ao que já é descrito em outros tipos de células, como macrófagos.

Em um modelo de infecção oral com *B. melitensis*, Paixão e colaboradores (2009) observaram em 8 hs após infecção, alta carga bacteriana no colon e cecum, diminuindo rapidamente durante uma cinética de infecção (1, 3, 7 e 14 dpi), persistindo um número baixo de bactérias no intestino grosso até 21 dias pós-infecção. No íleo, foi observado um declínio leve ao longo da infecção. Um pequeno número de bactérias foi encontrada no linfonodo mesentérico (LMN), baço e fígado às 8hs e 1 dpi, aumentando significativamente em 3 e 7 dias, estabilizando em 14 e 21 dias. Nas placas de Peyer (PP), a carga bacteriana foi muito baixa durante toda a infecção, com aumentos significativos em 7 e 14 dias, ficando em níveis bem reduzidos em 21 dias, indicando que a colonização nas PPs é transitória.

A infecção por *Brucella melitensis* não desencadeou resposta inflamatória intestinal robusta. O mesmo foi observado durante a infecção por *B.abortus* (Barquero-Calvo et al., 2007). Sendo estes dados consistentes com a visão de que a *Brucella spp.* são patógenos silenciosos que evitam a ativação da resposta imune durante o estabelecimento da infecção.

Relatos recentes identificaram genes da *Brucella* que podem ser importantes para a sobrevivência bacteriana no trato digestivo e, conseqüentemente, estabelecer infecção

sistêmica em camundongos (Delpino et al., 2007). Os genes que codificam a urease são necessários para estabelecer a infecção por *B. suis* e *B. abortus* através da via oral em camundongos (Bandara et al., 2007). A urease é uma enzima com múltiplas subunidades, envolvida no metabolismo do nitrogênio, que causa um aumento no pH devido à produção de amônia como resultado da hidrólise da uréia (Collins and D'Orazio, 1993). *B. abortus* e *B. suis* têm dois operons de urease não adjacentes (Chain et al., 2005). O operon *ure1* é responsável pela atividade da urease, e sua inativação causa atenuação da infecção (Paixao et al., 2009) em camundongos inoculados através da via oral (Sangari et al., 2007).

Diante do exposto acima, apesar da via oral ser uma rota principal da infecção natural causada pela *B. abortus*, poucos estudos tem se aprofundado no entendimento da relação entre a *Brucella* a componentes do sistema imune do trato intestinal. Portanto o presente trabalho visa investigar os mecanismos envolvidos no processo de invasão e estabelecimento da infecção pela *Brucella abortus* por via oral, explorando o papel do receptor ST2 na homeostase e microbiota intestinal.

1.4. IMUNIDADE INTESTINAL

O Trato gastrointestinal é o sistema que possui maior interação do organismo com o meio externo. Estima-se que a extensão do intestino delgado humano seja de 300m² (Moog, 1981), sendo responsável por lidar com os componentes da dieta e por ser fonte de estímulos antigênicos. Para realizar essas funções, é necessária a presença de bactérias comensais da microbiota. Os elementos imunes inatos da mucosa intestinal possuem a capacidade de reconhecer antígenos da microbiota, bem como de proteínas alimentares, evitando uma resposta inflamatória a esses antígenos benignos, processo esse denominado como tolerância intestinal. Se o processo é interrompido, a resposta imune é ativada (Marina Garcia-Miguel, M.Julieta Gonzalez, Rodrigo Quera, et al., 2013).

O sistema imune inato intestinal envolve quatro principais linhas de defesa: a microbiota do hospedeiro, a camada de muco, o epitélio e a lâmina própria. Quando essas barreiras são danificadas, a tolerância imunológica pode ser afetada (Marina Garcia-Miguel, M.Julieta Gonzalez, Rodrigo Quera, et al., 2013).

1.4.1 A MICROBIOTA

Aproximadamente 90% das células do corpo humano são micróbios que residem em superfícies expostas ao ambiente (Cani e Delzenne, 2011). A superfície corporal mais

colonizada é o intestino, que abriga cerca de 100 trilhões de microrganismos constituídos por pelo menos 1000 espécies bacterianas (Frank e Pace, 2008). A microbiota intestinal beneficia o hospedeiro de muitas maneiras, inclusive contribuindo para as funções metabólicas (Tremaroli e Bäckhed, 2012 ; Karlsson et al., 2013 ; Wichmann et al., 2013), estimulando os compartimentos imunes intestinal e sistêmico (Talham et al., 1999 Mazmanian et al., 2005) e manutenção da homeostase da mucosa (Atarashi et al., 2008; Ivanov et al., 2009 ; Maynard et al., 2012).O intestino é considerado um ambiente com amplo número de espécies de bactérias distintas. São encontradas em toda região gastrointestinal, entretanto, no estômago e no intestino delgado encontra-se em menores quantidades devido ao contato e ação bactericida do suco gástrico. No íleo, ha uma área de transição e o cólon apresenta condições favoráveis para o crescimento bacteriano devido a escassez de secreções intestinais e abrangente fonte de nutrição (Guarner, 2007). As bactérias que integram o trato gastrointestinal são em sua maioria anaeróbicas, destacando-se os gêneros *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* e *Fusobacterium* (Guarner; Malagelada Junior, 2003). A microbiota intestinal também desempenha um papel protetor contra patógenos invasores. Por exemplo, a competição por espaço, aumento da competição por nutrientes e indução de IgA são mecanismos pelos quais as bactérias comensais ajudam a limitar a colonização de patógenos (Srikanth e McCormick, 2008 ; Jarchum e Pamer, 2011 ; Haag et al., 2012 ; Buffie e Pamer, 2013). Patógenos podem alterar a composição do estado estacionário da microbiota e promover a patogênese. Por exemplo, a colonização por *Citrobacter rodentium* ou *Salmonellatyphimurium* se beneficia da alteração da proporção de espécies comensais causada pela inflamação mediada pelo hospedeiro (Lupp et al., 2007 ; Stecher et al., 2007). A produção de IFN- γ durante a infecção por *Toxoplasma gondii* elimina as células de Paneth, resultando em expansão descontrolada de *Enterobacteriaceae* comensais, favorecendo à patologia mediada pelo *T. gondii*. (Raetz et al., 2013).

1.4.2 O MUCO

O trato gastrointestinal é coberto por uma camada de muco que protege o epitélio dos antígenos luminiais e fornece lubrificação para promover o bolo alimentar. No estômago e cólon, o muco consiste em duas camadas: uma camada bem aderida ao epitélio, cerca de 30 μ m de espessura, e outra camada facilmente removível, cerca de 450 μ m de espessura. Apenas a segunda camada esta presente em outras áreas, como o intestino delgado. O muco varia em quantidade e composição protéica em diferentes áreas do trato

gastrointestinal. O muco é mais abundante no cólon, devido ao maior conteúdo bacteriano. As principais proteínas constitutivas são mucinas (MUC), com diversos isotipos em diferentes porções do trato gastrointestinal. No intestino delgado, as mucinas mais abundantes são MUC2, MUC3 e MUC6, enquanto no cólon a proteína principal é MUC2. No entanto, as células do TGI também expressam outras mucinas, como MUC1, MUC3, MUC4, MUC11 e MUC12 (McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, *et al.*, 2011)

Diferentes isoformas de MUC resultam em maior ou menor adesão da camada de muco ao epitélio. Algumas mucinas, como MUC1, aderem firmemente à camada epitelial. Estas proteínas são expressas principalmente em enterócitos. Essa barreira da mucosa é importante para deter a invasão de bactérias, como mostrado em camundongos deficientes em MUC1 (MUC1^{-/-}), que são incapazes de eliminar *Campylobacter jejuni* e sucumbem a uma infecção sistêmica (McAuley JL, Linden SK, Chin WP, *et al.*, 2007). Por outro lado, outros MUCs são sintetizados e secretados por células caliciformes que constituem a camada de muco mais facilmente removível (Gendler SJ, Spicer AP, 1995; Gum JR, Jr., Crawley SC, Hicks JW, *et al.*, 2002).

As células caliciformes exibem uma morfologia característica que se assemelha a uma taça alongada, devido a uma grande porção apical que contém os grânulos de mucina. A diferenciação de células caliciformes é parcialmente dependente da presença de bactérias no TGI. Em camundongos *germ free*, as células caliciformes são menores e reduzidas em número, quando comparadas aos camundongos do tipo selvagem (Deplancke B, Gaskins HR, 2008).

MUC2 é a proteína mais abundante no cólon. Tem uma massa de 540 kDa e é composto por mais de 85% de resíduos glicosídicos. Em termos da estrutura de aminoácidos de MUC2, os domínios centrais são pouco conservados e ricos em repetições em série. Grandes quantidades de resíduos de prolina, treonina e serina tornam esses domínios suscetíveis a O-glicosilações (Carlstedt I, Herrmann A, Karlsson H, 1993; Van Passel MWJ, Kant R, Zoetendal EG, *et al.*, 2011) bem como a incorporação de grupos sulfato e siálico, auxiliando na capacidade de se ligar a água e diferentes patógenos. A ausência de enzimas biossintéticas de MUC2 que catalisam a primeira O-glicosilação no aparelho de Golgi (GalNAc) promove o desenvolvimento espontâneo de colite em camundongos (Fu J, Wei B, Wen T, *et al.*, 2011). Além disso, as glicosilações de MUC2 podem ser metabolizadas por bactérias comensais ou patogênicas intestinais, servindo como fonte de energia (Kim YS, Ho SB, 2010; Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, *et al.*, 2005) sugerindo um papel na seleção da microbiota intestinal.

1.4.3 O EPITÉLIO INTESTINAL

As células epiteliais são organizadas em criptas vilosas e intestinais (Criptas de Lieberkühn). As vilosidades do intestino delgado são mais longas e criptas mais rasas do que suas contrapartes no cólon. O epitélio intestinal é composto por uma monocamada de células polarizadas de replicação rápida de três tipos: enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas. Os enterócitos são as células mais abundantes. Essas células permitem a absorção de nutrientes e proteínas microbidas, como defensinas e catelicidinas (Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A, 2005). Células caliciformes secretam muco intestinal, e as células enteroendócrinas produzem hormônios, como a serotonina, a substância P e a secretina. Essas células estão localizadas na base da cripta junto com as células de Paneth, que secretam α -defensinas, fosfolipase A2 (PLA2), lisozimas e outros peptídeos antimicrobianos (Bevins CL, Salzman NH, 2011; Höcker M, Wiedenmann B, 1998).

Outras células envolvidas na imunidade intestinal são as células M, localizada nas placas de Peyer (PP). Eles são particularmente abundantes nos folículos linfóides do intestino delgado, uma área escassa em células caliciformes e sem camada de muco. A função das células M é translocar e apresentar antígenos derivados da microbiota para células dendríticas (DC) e macrófagos (Marina Garcia-Miguel, M.Julieta Gonzalez, Rodrigo Quera, *et al.*,2013).

1.4.4 LÂMINA PRÓPRIA

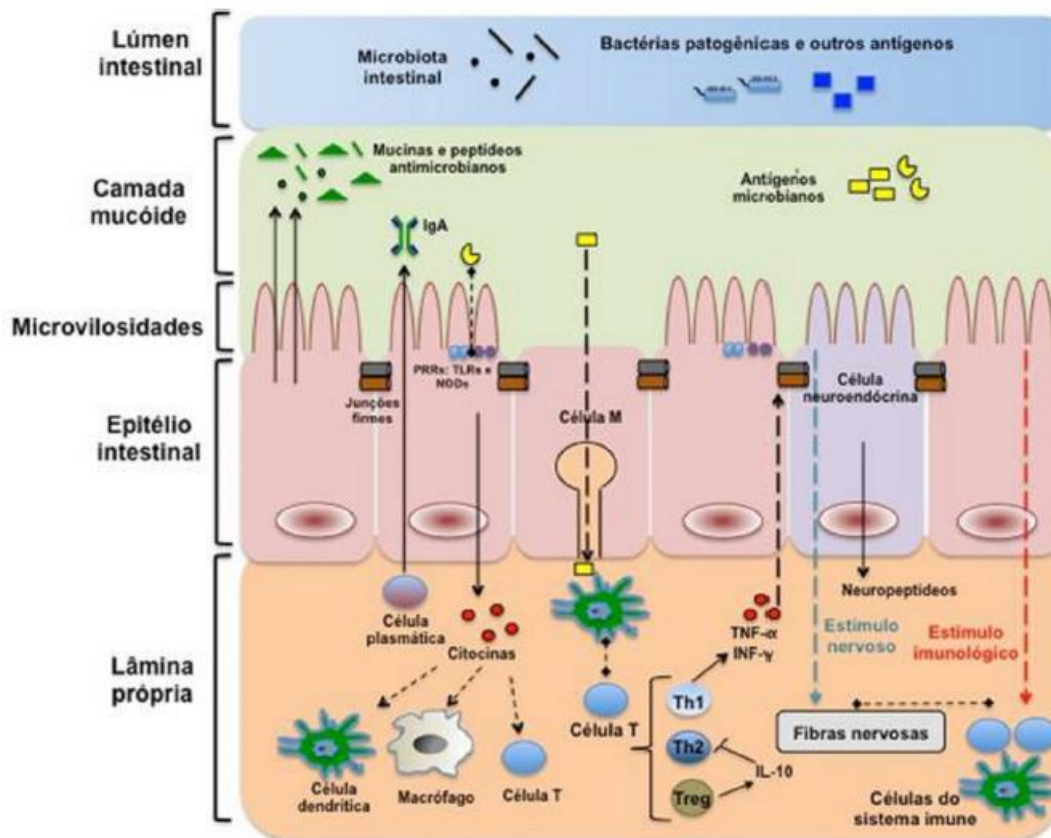
A quarta linha de defesa intestinal, esta localizada abaixo da camada epitelial, chamada de lâmina própria. Ela é constituída de células inatas e imunes, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, NK e linfócitos (Marina Garcia-Miguel, M.Julieta Gonzalez, Rodrigo Quera, *et al.*,2013). As células dendríticas (DC), são células fagocíticas mieloides, que na mucosa intestinal estão localizadas na lâmina própria e nas placas de Peyer, atingindo o epitélio através de prolongamentos, sem comprometer a integridade epitelial, fagocitando antígenos luminiais independentes das células M. Além disso, as DC capturam o líquido extracelular através da macropinocitose e participam da apresentação de antígeno das células T nos linfonodos, iniciando respostas imunes adaptativas (Rutella S, Danese S, Leone G,2006; Coombes JL, Powrie F,2008).

Os macrófagos, células mieloides de vida longa, juntamente com neutrófilos e DC, são células fagocíticas centrais do sistema imunológico. Estas células expressam vários receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), cujos níveis são aumentados após a ativação celular. Já os macrófagos intestinais apresentam características tolerogênicas, com

baixa expressão de PRRs e outras proteínas de superfície, além de secretar quantidades limitadas de IL-1, IL-6 e IL-8. Entretanto, quando expostos a microbiota, podem expressar altos níveis de precursor de IL-1, indicando que eles contribuem ativamente para a tolerância da mucosa (Franchi L, Kamada N, Nakamura Y, 2012). Neutrófilos são células mieloides com meia-vida curta. São ricas em grânulos citoplasmáticos e possuem núcleo irregular. Quando ativados secretam moléculas antimicrobianas, espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e quimiocinas que recrutam células dendríticas e macrófagos para a mucosa (Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, 2010; Hayashi F, Means TK, Luster AD, 2003).

Os linfócitos T γ/δ intraepiteliais (IELs) são células linfóides com citoplasma granular, localizados no epitélio de vários órgãos, especialmente intestino, pele, pulmão e trato reprodutivo. Possuem um repertório limitado de TCR e são ativados por uma variedade limitada de antígenos, reconhecendo principalmente auto-antígenos expressos por células epiteliais em stress (Havran WL, Chien YH, Allison JP, 1991). Estes linfócitos produzem fator de crescimento de queratinócitos, que estimula a proliferação e diferenciação de células epiteliais (Boismenu R, Havran WL, 1994), bem como quimiocinas envolvidas no recrutamento de células T reguladoras na lâmina própria (Malinarich FH, Grabski E, Worbs T, et al, 2010).

Nos últimos anos, a interleucina-33 (IL-33) e seu receptor ST2 têm sido reconhecidos como crucial para a homeostase da resposta inflamatória epitelial, inclusive no epitélio intestinal (Marina Garcia-Miguel, M.Julieta Gonzalez, Rodrigo Quera, *et al.*, 2013).



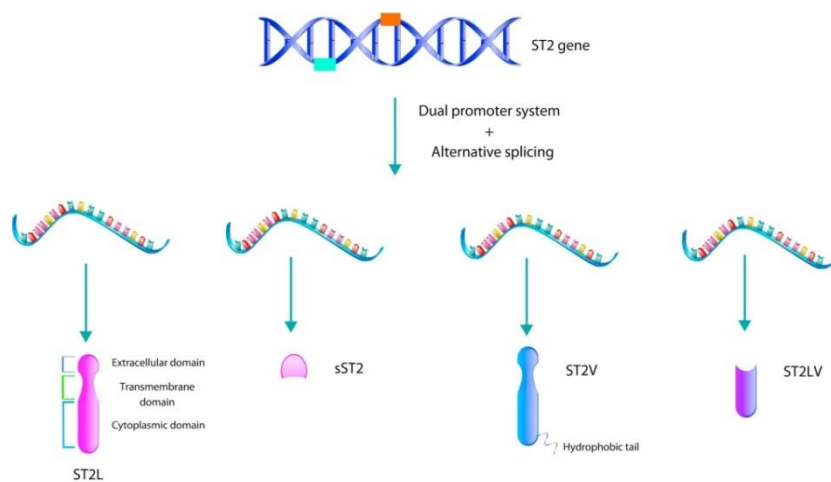
Oriá, Reinaldo. Sistema digestório: integração básico-clínica. In Rodrigues, Francisco Advane de Paulo. Fisiologia da barreira epitelial intestinal. São Paulo. Editora Edgard Blucher Ltda, 2016. P- (441)-(477). **Figura 1: Representação esquemática das Barreiras intestinais.** Diversos componentes atuam na manutenção da homeostase da Barreira. No lúmen intestinal, a microbiota residente tem papel protetor contra Bactérias patogênicas, evitando a colonização e invasão no epitélio. A camada mucóide, com peptídeos antimicrobianos e mucinas, funciona como Barreira para a penetração de antígenos microbianos. Tais substâncias são produzidas por células especializadas do epitélio intestinal, células caliciformes (mucina) e células de Paneth (peptídeos antimicrobianos). Células do epitélio intestinal são especializadas em endocitar e transportar antígenos para a lâmina própria (células M). Os mediadores inflamatórios liberados no processo (citocinas TNF- α e INF- γ) podem modificar as funções das junções firmes, levando a distúrbios de permeabilidade intestinal.

1.5 RECEPTOR ST2

O receptor ST2 da família IL-1, (supressor da tumorigenicidade 2, estimulação do crescimento expresso no gene 2, estimulação sérica 2), foi classificado como receptor para a IL-33 em 2005. (Schmitz J, Owyang A, Oldham E, *et al*, 2005; Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, *et al*, 1993). O gene do receptor ST2 está localizado no cromossomo 11p14.3-p12 em humanos e tem aproximadamente 40kb de comprimento. Homólogos do ST2 são encontrados nos genomas de camundongos, ratos e em *Drosophila melanogaster* (G Bergers, A Reikerstorfer, S Braselmann, *et al*, 1994; Iwahana, H., Yanagisawa, K., Ito-Kosaka, A., *et al*, 2001).

Existem 4 isoformas codificadas pelo gene ST2. As duas isoformas mais proeminentes incluem o ST2L transmembrana, atuando como um receptor de membrana, e o sST2, apresentando-se sob a forma solúvel. Eles são a consequência de um sistema duplo de promotores (sST2 promotor proximal e ST2L promotor distal) que resulta na expressão diferencial de mRNA. O ST2L, tal como outros receptores de IL-1, é constituído por um domínio extracelular, domínio transmembrana e domínio citoplasmático (Toll/interleukin-1 receptor (TIR)), enquanto que o sST2 não possui os domínios transmembrana e citoplasmático e, portanto, existe como uma proteína solúvel. Além disso, o splicing alternativo resulta na formação de ST2V e ST2LV. O ST2V compartilha o mesmo domínio extracelular e transmembrana que o ST2L, mas é notável por sua cauda hidrofóbica única e é particularmente enriquecido no trato gastrointestinal. Por fim, ST2LV notavelmente não possui o domínio transmembrana de ST2L, mas mantém o domínio intracelular. (Figura 2) (G Bergers, A Reikerstorfer, S Braselmann, *et al.*, 1994; Iwahana, H., Yanagisawa, K., Ito-Kosaka, A., *et al.*, 2001).

Vale ressaltar, que a nossa estratégia experimental se baseia na utilização de animais deficientes para todas as formas do receptor codificadas pelo gene do ST2.



Hodzica *et al.*; 2017

Figura 2 Isoformas do receptor ST2. Existem quatro isoformas de ST2 codificadas pelo gene ST2: As duas isoformas mais proeminentes incluem ST transmembranar e ST solúvel. Eles são a consequência de um sistema de duplo promotor que resulta na expressão diferencial de mRNA. O ST2L é constituído por um domínio extracelular, domínio transmembrana e domínio citoplasmático. O sST2 possui apenas o domínio extracelular, e, portanto, existe como uma proteína solúvel, agindo como um inibidor competitivo, tendo com função se ligar a IL-33 e inibir sua ligação ao ST2L, promovendo assim, uma resposta anti-inflamatória. As outras 2 isoformas, são resultantes de splicing alternativo, e suas funções ainda são desconhecidas.

O receptor ST2 é expresso em cardiomiócitos (Weinberg EO, Shimpo M, De Keulenaer GW, *et al*, 2002), e em uma grande variedade de células imunes, incluindo células T convencionais, particularmente células T reguladoras (Tregs) (Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, *et al.*, 1998), células inatas linfóides do tipo 2 (ILC2) (Neill DR, Wong SH, Bellosi A, *et al*, 2010), macrófagos polarizados M2 (Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, *et al*, 2009), mastócitos (Moritz DR, RH Rodewald, Gheyselinck J, *et al*, 1998), eosinófilos (Cereja WB, Yoon J, Bartemes KR, *et al.*, 2008), basófilos (Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, *et al*, 2008), neutrófilos (Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, *et al*, 2008), células NK (Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, *et al*, 2008) , células iNKT (Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, *et al*, 2008), e em outras várias células conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Expressão de ST2 e sST2 e sua regulação em células imunes.

Tipo de célula	ST2	Regulação ST2	sST2	Regulação sST2
Mastócito	+	Expresso constitutivamente	+	Fortemente induzida por IL-33 e fracamente por Ag ou SCF
Basófilo	+	Induzido pela estimulação de IL-3	+	Liberado após estimulação com IL-3
Eosinófilo	+	Fracamente expressa constitutivamente, mas fortemente induzida após estimulação com IL-33	?	
Th2	+	Expressa constitutivamente e aumentada por IL-6, IL-1, TNF- α e IL-5	-	
Th1	-		+	Liberado após estimulação com CD3 ou aloativação
Th17	-		+	Liberado após estimulação com CD3 ou aloativação
Célula T reguladora (Treg)	+	Constitutivamente expresso apenas em Tregs expressando GATA3; reforçada pela IL-33	-	
Th9	+	Constitutivamente expressado e aprimorado pela IL-33	?	
Célula Linfóide Inata tipo 2	+	Constitutivamente expressado e aprimorado pela IL-33	-	
Células dendríticas	+	Fracamente expressa constitutivamente, mas forte indução após o tratamento com	?	

		rapamicina		
Neutrófilo	+	Fraca constitutivamente expressa	?	
Macrófago	+	Fracamente expressa constitutivamente, mas reforçada por IL-4 e IL-13	+	Expresso constitutivamente
Célula B1 B	+	Expresso constitutivamente	?	
célula iNKT	+	Expresso constitutivamente	?	
Célula NK	+	Expresso constitutivamente	?	
Célula Tc1 T	+	Fraca constitutivamente expressa	+	Liberado após estimulação com CD3 ou aloativação
Célula Tc17 T	-		+++	Liberado após estimulação com CD3 ou aloativação

Griesenauer B, Paczesny S; 2017.

A IL-33 ativa a cascata de sinalização intracelular em células alvo, ligando-se primeiro as isoformas transmembrana de ST2 (Liew FY, Girard JP, Turnquist HR, 2016; Martin NT, Martin MU, 2016). O complexo de IL-33 e ST2 levam ao recrutamento de um co-receptor acessório de IL-1, o IL-1RacP e dimerização do domínio TIR (Schmitz J, Owyang A, Oldham E, *et al*, 2005; Liu X, Hammel M, He Y,*et al*, 2013). O heterodímero recruta proteínas de estrutura intracelular e quinases, incluindo proteína de resposta de diferenciação mieloide (MyD88), quinase associada a IL-1R, fator 6 associado ao receptor TNF (TRAF6), proteínas quinases ativadas por mitógeno (incluindo JNK, p38 e ERK), e fator nuclear kappa B (NF-kB) (Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M,*et al*, 2009; Martin MU, 2013; Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE,*et al*, 2007; Ali S, Huber M, Kollewe C,*et al*, 2007).

O receptor ST2 esta sujeito a regulação da sua expressão. Como muitos receptores transmembrana, o ST2 pode ser ubiquitinado na membrana após a ligação de IL-33 e direcionado para destruição em um mecanismo dependente de fosforilação (polimerização, internalização e degradação de ST2) (Zhao J, Wei J, Mialki RK,*et al*, 2012). A produção de sST2 mostrou ser aumentada por citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF α) em células epiteliais do pulmão e miócitos cardíacos. Além de poder ser produzido não só espontaneamente pelas células do pulmão, rim, coração e intestino delgado (Mildner M, Storka A, Lichtenauer M,*et al*, 2010), mas também após a ativação com IL-33 nos

mastócitos e células TCD4 e CD8 convencionais (Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B,et al,2015), após a administração de LPS em doadores saudáveis (Mildner M, Storka A, Lichtenauer M,et al, 2010), do fator 2 de crescimento de fibroblastos (Kunze MM, Benz F, Brauß TF,et al., 2016) e de ácido lipofosfatídico em outros estudos (Zhao J, Chen Q, Li H,et al, 2012). Além disso, a sinalização de IL-33/ST2 também pode ser limitada após o ligante se ligar ao receptor. O domínio de imunoglobulina IL-1r (SIGIRR ou TIR8) pode inibir a sinalização de IL-33 através da sua ligação ao complexo IL-33/ST2, impedindo a ligação do co-receptor IL-1RacP e posteriormente o recrutamento das moléculas intracelulares (Bulek K, Swaidani S, Qin J,et al, 2009). A citocina IL-23, uma citocina pró-inflamatória também já teve sua capacidade de inibição do eixo ST2/IL-33 descrita na Doença inflamatória intestinal (DII) (Hodzic Z, Schill EM, Bolock AM,et al., 2017). Outras regulações envolvendo os receptores ST2 e sST2 são descritas na Tabela 1.

1.5.1 O EIXO ST2/IL-33 NA IMUNIDADE INTESTINAL

O eixo ST2/IL-33 tem sido amplamente estudado desde sua descoberta por suas propriedades de grande relevância na imunidade da mucosa, tanto durante a homeostase quanto na inflamação. Originalmente, o eixo de sinalização IL-33/ST2 foi estudado no contexto de induzir respostas imunes do tipo 2, com a expressão de ST2 por células T auxiliares 2 (TH2). No entanto, o papel da IL-33 não está limitado a respostas TH2. Além disso, a IL-33 via receptor ST2 também é um potente ativador de células TH1, células linfóides inatas do grupo 2 (ILCs2), células T reguladoras (Treg) e células T CD8⁺. Deste modo, uma vez que o epitélio intestinal e o eixo IL-33/ST2, está posicionado para interagir com os principais componentes do intestino, que incluem as células epiteliais em resposta a lesão celular, o microbioma composto pelas bactérias comensais, bactérias patogênicas ingeridas e células imunes da mucosa, decidimos avaliar o papel do receptor ST2 e sua ativação na resposta imune contra à infecção pela *Brucella abortus* (Hodzic Z, Schill EM, Bolock AM,et al, 2017).

Como uma alarmina, a IL-33 é uma das primeiras moléculas que “soa o alarme” para indicar que houve uma violação nas defesas primárias do epitélio intestinal contra agentes patogênicos e outras ameaças (Martin NT, Martin MU, 2016). O epitélio do intestino serve como uma das primeiras linhas de defesa do intestino contra patógenos, antígenos e toxinas ingeridos (Turner JR, 2009). De modo a manter a integridade desta barreira da mucosa, o epitélio intestinal sofre auto-renovação rápida e contínua para substituir células danificadas. Esse processo é mediado por um caminho bem estabelecido no quais células-tronco

intestinais das criptas amadurecem e se diferenciam em um dos muitos tipos de células que compõem a barreira da mucosa (Camilleri M, Madsen K, Spiller R, *et al.*, 2012). A ativação da via IL-33/ST2 em células progenitoras epiteliais leva a inibição da sinalização de Notch e resulta na diferenciação de células-tronco em direção a uma linhagem de células intestinais secretoras (Mahapatro M, Foersch S, Hefele M, *et al.*, 2016). Como já citado, sabe-se que as células caliciformes desempenham um papel importante na imunidade intestinal produzindo mucina, o principal constituinte do muco, um importante mecanismo de barreira para diminuir a interação entre o epitélio e as bactérias patogênicas (Liew FY, Girard JP, Turnquist HR, 2016). Em conjunto, estas observações demonstram um papel importante da sinalização de IL-33/ST2 na manutenção da barreira física do epitélio da mucosa intestinal como a primeira linha de defesa contra patógenos. Enquanto a IL-33 é necessária para manter a barreira intestinal, uma vez que a barreira é violada, esta citocina continua atuando contra patógenos recrutando e ativando células imunes inatas para promover uma resposta inflamatória do tipo 2 (Martin NT, Martin MU, 2016). Uma resposta inflamatória do tipo 2 é caracterizada pelo envolvimento de células TH2 e pela presença de citocinas específicas, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, produzidas por células imunes inatas e adaptativas com o objetivo final de reparação do tecido e manutenção da função da barreira após a destruição do tecido (Cohen ES, Scott IC, Majithiya JB, *et al.*, 2015).

Uma classe de células recentemente identificados, as células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2s), são células imunes inatas presentes predominantemente nas mucosas e estão envolvidas na sinalização da IL-33 via ST2, especificamente na promoção da resposta imune do tipo 2 (Liew FY, Girard JP, Turnquist HR, 2016; Wynn TA, 2015; Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, *et al.*, 2010). As ILCs são aumentadas em superfícies de barreira da mucosa e foram demonstradas como integrantes do reparo da mucosa no contexto de infecções (Klose CS, Artis D, 2016; Lopetuso LR, Scaldaferri F, Pizarro TT, 2012). Estudos recentes mostraram que a IL-33 ativa as ILC2s no intestino para produzir o fator de crescimento anfiregulina (AREG) (Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, *et al.*, 2015). AREG se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) para promover a reparação do tecido durante a inflamação para restaurar a integridade da mucosa (Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, *et al.*, 2015). A ruptura do eixo de sinalização AREG / EGFR foi implicada em pacientes humanos e modelos murinos de doença inflamatória intestinal (Yan F, Cao H, Cover TL, *et al.*, 2011; Sipos F, Muzes G, Valcz G, *et al.*, 2010).

No entanto, diversos mecanismos atribuídos ao receptor ST2 permanecem desconhecidos e/ou discutíveis, como seu papel no intestino envolvendo o reconhecimento, interação e

alteração da susceptibilidade do hospedeiro frente à invasão e multiplicação de patógenos, o que precisa ser melhor estudado.

1.6 JUSTIFICATIVA

Apesar de a brucelose ser uma zoonose de escala mundial, os mecanismos envolvidos durante o curso e estabelecimento da infecção natural pela via oral por *Brucella abortus*, ainda são pouco elucidados. No que refere ao processo de invasão da *Brucella* através das barreiras da mucosa, pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos ou mesmo da capacidade deste patógeno de interagir com as células epiteliais do trato gastrointestinal, com a microbiota do hospedeiro e, tampouco, a resposta imunológica e homeostática subsequentes no TGI. A via intraperitoneal é a mais comumente utilizada nos estudos em modelo murino, objetivando favorecer a disseminação sistêmica imediata da *Brucella* e sua proliferação em tecidos linfóides, principalmente no baço. Porém, tendo em vista que a via oral é a principal rota de infecção natural no homem e nos animais, torna-se essencial seu melhor entendimento. Cabe salientar que a entrada da *Brucella* no trato gastrointestinal tem sido associada ao transporte pelas células M, atingindo facilmente os macrófagos e células dendríticas da lâmina própria (Ackermann et al., 1988; Pappas et al., 2006). Portanto, ainda há um universo de mecanismos a ser explorado no sentido de melhor compreender a rota natural dessa infecção. Sendo de fundamental importância sua compreensão para que novas estratégias terapêuticas possam ser desenvolvidas com intuito de controlar essa zoonose. Somado a isso, o eixo ST2/IL-33 vem sendo recentemente estudado como um importante fator na manutenção da homeostase intestinal e na defesa contra patógenos em vários modelos de infecções virais e bacterianas, mas ainda carece de informações a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta imune mediada através da via do IL-33/ST2. Assim, este trabalho visa avaliar o papel do receptor ST2 em um modelo murino de infecção oral pela bactéria *Brucella abortus* (Ba) e compreender o impacto da ausência deste receptor na barreira epitelial, na microbiota e no controle da infecção, utilizando-se, para tanto, como estratégia experimental animais deficientes para esse receptor .

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Elucidar o papel do receptor ST2 durante a infecção oral por *Brucella abortus*, avaliando o impacto da ausência deste receptor na barreira epitelial intestinal, na microbiota e no controle da infecção.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a susceptibilidade *in vivo* à infecção pela *B. abortus* por via oral e via intraperitoneal através da determinação do número de unidades formadoras de colônias no baço, fígado e linfonodos mesentéricos de camundongos selvagens Balb/c (WT) e deficientes para ST2 (ST2^{-/-}) em 3 e 14 dias após à infecção;

2.2.2 Avaliar a integridade da barreira epitelial intestinal em animais WT e ST2^{-/-} após a infecção com a *B. abortus* por via oral;

2.2.3 Comparar o perfil de células inflamatórias (neutrófilos e eosinófilos) intestinais e células totais durante a infecção oral e sistêmica pela bactéria *B. abortus* em animais WT e ST2^{-/-};

2.2.4 Avaliar a produção de citocinas e mediadores inflamatórios envolvidas na resposta imune intestinal e sistêmica em animais WT e ST2^{-/-} antes e após a infecção pela *B. abortus*;

2.2.5 Caracterizar o perfil da microbiota intestinal dos animais WT e ST2^{-/-} antes e após a infecção a infecção oral por *B. abortus*.

2.2.6 Comparar a expressão dos transcritos por qPCR de moléculas produtoras de muco MUC1 e MUC2, e de Anfirregulina no intestino delgado, antes e após a infecção oral por *B. abortus* em animais WT e ST2^{-/-};

2.2.7 Avaliar a composição da microbiota comensal em camundongos WT e ST2^{-/-} antes e após à infecção oral por *B. abortus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos com 8 a 12 semanas de idade das linhagens Balb/c (WT), e deficientes para ST2 (ST2^{-/-}). Os animais foram doados pelo Prof. José Carlos Alves Filho da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Os camundongos foram criados no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB/UFMG. Todos os animais foram mantidos em biotério livre de patógenos, com ambiente controlado e livre acesso à alimento e água. Para realização de todos os experimentos foram utilizados grupos de 5 a 7 animais por grupo. Os procedimentos para experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais - CEUA/UFMG.

3.2 BACTÉRIA, CONDIÇÕES DE CULTIVO E INFECÇÃO *IN VIVO* DOS ANIMAIS

Foi utilizada bactéria da espécie *Brucella abortus*, cepa virulenta 2308. Para o estoque a bactéria foi crescida em meio BB (*Brucella Broth*) (BD Biosciences, EUA) por 72 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm, lavadas em PBS por 10 minutos, 4800 rpm a 4°C e ressuspensas em 1 mL de PBS:glicerol na proporção de 9:1. Foram estocadas a -80°C, após quantificação, estavam prontas para uso. Para preparo do inóculo, a bactéria foi crescida em meio BB por 24 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm, lavadas em PBS por 10 minutos, 4800 rpm a 4°C e ressuspensas em PBS estéril. Para as infecções por via oral, os camundongos foram infectados através de gavagem intragástrica com 100 µL contendo 1x10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. abortus*. Para infecção sistêmica, os camundongos foram infectados por via intraperitoneal com 100 µL contendo 1x10⁷ UFC de *B. abortus*. Em todos os casos, animais controle receberam volume equivalente de solução salina pela via correspondente. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seguido de deslocamento cervical, em diferentes tempos de infecção (3 e 14 dias) para a retirada dos seguintes órgãos: intestino delgado, cólon, fígado, baço e linfonodos mesentericos, também, coleta do fluido intestinal, sangue e fezes.

3.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (CFU)

O baço, fígado e linfonodos mesentericos extraídos de cada animal foram macerados em solução salina (NaCl 0,9%), na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de tecido, com o auxílio de pequenas telas de aço e diluídos serialmente. As diluições foram plaqueadas em duplicata, em meio BB (*Brucella Broth*) ágar. As placas foram incubadas à

37°C e a contagem de UFC foi realizada 3 dias após o plaqueamento. Os resultados foram expressos como a média de UFC por miligrama de tecido.

3.4 ENSAIO DE PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VIVO*

O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificação da função de barreira foi realizado utilizando-se o método adaptado de FITC-labeled dextran (Yan et al., 2009). Alimento e água foram removidos e, após 3 horas, os camundongos foram pesados e receberam inoculação intragástrica de FITC-dextran (0,6 mg/g de peso corporal, PM 4000; Sigma-Aldrich, EUA). Quatro horas após a gavagem, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (Syntec, Brasil) (0,6 mL de cetamina na concentração de 100 mg/mL, 0,4 mL de xilazina na concentração de 20 mg/mL e 4 mL de salina), o sangue retirado por punção cardíaca e, posteriormente, eutanasiados. O sangue foi centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos à 4°C e o soro coletado foi pipetado no volume de 100 µL/poço em placa de 96 poços (Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA). A medida da intensidade de fluorescência de cada amostra (excitação, 492 nm; emissão, 525 nm; Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., EUA) foi realizada. A medida da permeabilidade intestinal foi expressa como média da unidade de fluorescência. O aumento da fluorescência no soro indica aumento da permeabilidade intestinal.

3.5 MEDIDA DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. O protocolo de dosagem dessa enzima em tecidos previamente homogeneizados foi realizado com algumas modificações (Vieira et al., 2009). Sumariamente, fragmentos de intestino delgado e cólon dos animais foram removidos e congelados a -80°C. Após o descongelamento, o tecido foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA) (100 mg de tecido em 1,0 mL de tampão), utilizando-se homogeneizador de tecidos, centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido

e a atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando Tetramethylbenzidine (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Multiskan FCThermo Scientific, EUA).

3.6 MEDIDA DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO)

A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos no tecido foi utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia intestinal (Vieira et al., 2009). Para tanto, para cada 100 mg de tecido pesado (intestino delgado e cólon), foi adicionado 1,0 mL de PBS 5X (pH 7.2), em seguida o tecido foi homogeneizado, no homogeneizador de tecidos, e centrifugado a 10.000 rpm (12.000 g) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriormente utilizadas e o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi ressuspensionado em 1,0 mL de PBS (pH 7.4), contendo HTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide; Sigma) 0,5%, para cada 100 mg de amostra. Dessa solução foi recolhida uma alíquota de 1 mL e transferida para um microtubo de 1,5 mL, seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, 75 µL por poço de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) foi incubada com 75 µL de substrato [o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma) 1,5 mM, em tampão Tris-HCl - 0,075 µM, pH 8, suplementado de H₂O₂ 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura ocorreu em leitor de microplacas (Multiskan FC Thermo Scientific, EUA) com filtro de 492 nm.

3.7 DOSAGEM DE CITOCINAS

Para avaliação da produção de citocinas, fragmentos do intestino delgado e cólon com aproximadamente 100 mg foram homogeneizados, utilizando-se homogeneizador de tecidos (T10 Basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Alemanha), em 1mL de solução de extração de citocinas - PBS contendo coquetel de anti-proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem. A dosagem das citocinas foi realizada pelo método de ELISA de captura

utilizando os kits adquiridos da R&D Systems (DuoSet) (R&D Systems, EUA), de acordo com as recomendações dos fabricantes.

3.8 ANÁLISE DO PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL

Após a eutanásia dos animais, foi realizada a coleta do fluido intestinal e fezes do intestino delgado, ceco e cólon, em quantidades proporcionais, para análise da microbiota intestinal. Realizada de forma estéril, as amostras foram pesadas e diluídas serialmente em PBS e semeadas através da técnica de espalhamento em superfície utilizando alças descartáveis. O espalhamento foi realizado nos seguintes meios de cultura enriquecidos, seletivos e/ou diferenciais: Ágar Sal Manitol — para isolamento de *Estafilococos* —; Ágar MacConkey (MAC) — seletivo para *Enterobactérias* —; Ágar Brain Heart Infusion (BHI) com Azida Sódica — isolamento de *Enterococos* —; Ágar Sangue — Base rica, fornece condições de crescimento para diversos microrganismos inclusive *Streptococcus* spp.—; Ágar MRS Lactobacilos — cultivo de *Lactobacilos* e *Bifidobactérias* —; *Bacteroides* Bile Esculina (BBE) — cultivo de *Bacteroides*; Sabourand + Cloranfenicol — cultivo de fungos patogênicos e leveduras e Meio rico em mucina. As placas foram incubadas na presença ou ausência de oxigênio, à 37°C, e a contagem de UFC foi realizada 3-4 dias após o plaqueamento. Os resultados foram expressos como a média de UFC por miligrama de fezes.

3.9 qPCR EM TEMPO REAL: EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

Para avaliação da expressão de transcritos de MUC1, MUC2 e Anfirregulina, foi extraído o RNA total de cortes do intestino delgado através do protocolo de extração TRIzol® (Invitrogen, Brasil) com auxílio de homogeneizador de tecidos (T10 Basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Alemanha). O RNA total foi quantificado em Nanodrop (ThermoScientific, USA) a 260 nm e armazenado a -80°C até ser utilizado para a síntese do cDNA de fita simples.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando os seguintes reagentes: 8 µL de RNA total à 2µg, 3,75 µL de água RNase Free, 2,0 µL de oligodT, 1,25 µL de dNTPs, 4,0 µL Tampão 5X e 1,0 µL Transcriptase Reversa de acordo com as instruções do fabricante. Este processo foi realizado em 2 etapas, no termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) sendo a programação: Programação I: de 70°C por 10 minutos e repouso a 4°C e programação II: 42°C por 60 minutos, seguido de 70°C por 15 minutos e repouso a 4°C.

3.9.1 DESENHO DOS PRIMERS

A sequência dos exons dos genes de interesse foi retirada do Banco de dados *EnsemblGenome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). As sequências foram colocadas no programa *Primer3 v.0.4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), restringindo-se o tamanho do produto a 70-150 Bases; tamanho do iniciador entre 19-21 Bases; temperatura de *melting* entre 59-61°C conteúdo GC variando entre 40-60%. Em seguida os pares de iniciadores obtidos foram avaliados através do programa *NetPrimer* (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) para evitar pares com grandes defeitos estruturais. Por fim, as sequências com menores defeitos estruturais foram analisadas no Banco de dados *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). O tamanho do transcrito a ser amplificado e a especificidade dos iniciadores foram avaliados. Apenas os iniciadores com poucos erros estruturais e específicos para o gene foram sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil). As sequências dos iniciadores Anfirregulina foram retiradas dos trabalhos realizados por Hu e colaboradores (2015) e Canesso e colaboradores (2017) respectivamente. Os demais *primers* foram desenhados conforme descrito acima e suas sequências estão disponíveis na tabela 2:

Gene	Forward	Reverse
18S	CGTTCCACCAACTAAGAACG	CTCAACACGGGAAACCTCAC
Muc1	GAAGACCCAGCTCCAATA	TCCCCAGAAAATCTCCGTTA
Muc2	CACCAACACGTCAAAAATCG	CGCAGAACTCCCAGTAGCA
Anfirregulina	GCCATTATGCAGCTGCTTTGGAGC	TGTTTTTCTGGGCTTAATCACCT

Tabela 2: Sequências dos iniciadores utilizado na realização da curva de diluição e na quantificação relativa por PCR em tempo real. Gene de referência escolhido para normalizar os dados foi o 18S e genes alvo foram o MUC1 *mucin 1*; MUC2, *mucin 2* e Anfirregulina *Amphiregulin*.

3.9.2 REAÇÃO DE qPCR EM TEMPO REAL

A qPCR foi realizada utilizando o SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio3 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.9.3 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS DE qPCR EM TEMPO REAL

A análise da expressão diferencial de transcritos foi calculada pelo método $\Delta\Delta C_t$ utilizando a média geométrica do gene de referência 18S. A média aritmética das amostras do grupo controle foi utilizada como fator calibrador para o cálculo das quantidades relativas dos

outros grupos, considerando a eficiência real da curva de diluição para cada gene. Ademais, para cada gene, um controle negativo (NTC, *non-template control*) e uma curva de *melting* foram examinados.

3.10 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES

Para contagem das células sanguíneas, os animais foram sacrificados por anestesia (cetamina/xilazina) seguida de deslocamento cervical e 20 µL de sangue foram recolhidos do plexo braquial e adicionados a 180 µL de solução de Turk para a contagem total de leucócitos circulantes utilizando câmara de Neubauer.

3.11 CULTURA DE ESLENÓCITOS

Para análise dos níveis de produção de IFN-γ por células T em cultura de esplenócitos, os animais foram infectados por via intraperitoneal, e após 14 dias de infecção realizado eutanásia. O Baço foi coletado e a suspensão de células resultante da maceração dos Baços foi tratada com tampão de lise ACK (10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl, pH 7.2 em água destilada) por 5 minutos, seguido de lavagens com solução salina 0,9% NaCl para eliminar hemácias e outras impurezas. Em seguida as células foram contadas e plaqueadas na concentração de 10⁶ células/poço em placas de 96 poços e submetidas ao processo de imunofenotipagem.

3.12 DERIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDMs)

Os BMDMs foram diferenciados *in vitro* a partir de células-tronco extraídas do fêmur de camundongos. As culturas foram diferenciadas por 7 dias em estufa a 37°C, 5% CO₂ em meio DMEM suplementado com 1% de HEPES, 20% de soro fetal bovino (SFB), 30% de meio condicionado por células L929 (LCCM) fonte de M-CSF (importante para diferenciação de células progenitoras em macrófagos), 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de streptomycin. Após a diferenciação, os macrófagos foram coletados pela lavagem das monocamadas com PBS gelado, distribuídos em placas de cultura e cultivados em meio DMEM, contendo 1% SFB e 1% HEPES ou 10% SFB e 1% HEPES, dependendo do experimento.

3.13 ENSAIO DE MEDIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Para a determinação da concentração de óxido nítrico (NO) em BMDM, após o processo de derivação, 50µl do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços (Nunc, Thermo

Fisher Scientific, EUA) e foi adicionado 50ul da solução "C". A reação gera mudança de cor para rosa, em torno de 10's, e a leitura ocorreu em leitor de microplacas (Multiskan FC Thermo Scientific, EUA) com filtro de 550 nm. Reagentes: Solução "A": Sulfinilamida 1% em 2,5% de ácido fosfórico (H_3PO_4). Solução "B": N (Naphthyl)- Etyl-endedamine 0,1% em 2,5% de ácido fosfórico (H_3PO_4). Solução "C": Misturar solução "A" e solução "B" na proporção de 1:1 no momento do uso. Reagente para curva padrão: $NaNO_2$ mM. Preparo curva padrão: Foi adicionado 50ul de meio (RPMI ou DMEM) e 100ul do reagente para a curva padrão na concentração de 200 μ M e posteriormente realizado diluição seriada.

3.14 CITOMETRIA DE FLUXO

Após os processamento já descrito para a realização da cultura de esplenócitos, as células foram ajustadas para 1×10^6 cells por poço, plaqueadas e incubadas com brefeldina A (5 μ p/mL) (100ul/well) por 4hs. Após o período de 4hs, a placa foi centrifugada a 1200rpm, a 4°C por 7 minutos, flicada e vortexada, e as células ressuspendidas em 200ul de Wash A. A placa foi centrifugada novamente (1200rpm 4°C 7 minutos), flicada e vortexada, e as células foram incubadas em 30ul de Fc block (1:50) em ADS por 20 minutos a 4°C. Após o período de incubação, foi adicionado 200ul de Wash B e as placas foram centrifugadas (1200rpm 4°C 7 minutos) flicadas e vortexadas e as células foram ressuspendidas em 30ul de Mix de anticorpos de superfície (CD4 PE, CD8 FITC, CD3 PercP, CD25 FITC, CD4 APCcy7, CD3 Biotin) (1:200) e incubadas por 20 minutos protegido da luz. Após o período de incubação, foi adicionado 200ul de Wash B e a placa foi centrifugada (1200rpm 4°C 7 minutos), flicada e vortexada. Posteriormente a placa foi incubada com streptavidina conjugada com PeCy7 (1:200) e incubada por 20 minutos a 4°C protegido da luz. Após este período, o volume foi completado para 200ul com Wash B e a placa foi centrifugada (1200rpm 4°C 7 minutos), flicada e vortexada. Posteriormente as células foram incubadas com 100ul de Cytofix/Cytoperm (BD) e incubadas por 20 minutos a 4°C protegido da luz. Após este período, o volume foi completado para 100ul com Permwash (BD) e centrifugadas (1200rpm 4°C 7 minutos), flicada e vortexada. As células foram ressuspendidas em 30ul do mix de anticorpos intracelular (IFN- γ APC, FOXP3 PE) (1:50) e incubado por 30 minutos a 4°C protegido da luz. Após este período o volume foi completado para 200ul com Permwash (BD) e a placa foi centrifugada (1200rpm 4°C 7 minutos), flicada e vortexada. As células foram ressuspendidas em 200ul de Wash B e centrifugadas (1200rpm 4°C 7 minutos), a placa flicada e vortexada. As células foram ressuspendidas com 200ul de PBS. A análise de quantificação das células foi realizada no Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems). Os dados gerados pelo citômetro foram analisados utilizando o programa

Flowjo 10 (Tree Star, Inc., Oregon, USA). Reagentes: Wash A: PBS1x. Wash B: PBS1x + 0,5% BSA. ADS: 1:1 Wash A e B. Cytofix/Cytoperm e Permwash: de acordo com o fabricante.

Anticorpos: CD4 PE, CD8 FITC, IFN- γ APC, CD3 PercP, CD25 FITC, FOXP3 PE, CD3 Biotin, Streptavidin PeCy7 e CD4 APCcy7.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram comparados usando análise de variância One-way ANOVA seguida por um pós-teste de Student-Newman-Keuls e *Test t* utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Foram considerados significativos resultados em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Quais fatores estão envolvidos no processo de invasão da Brucella abortus no modelo de infecção por via oral?

4.1 Avaliação da susceptibilidade *in vivo* à infecção oral por *Brucella abortus* em camundongos WT versus ST2^{-/-}

A susceptibilidade à infecção oral por *Brucella abortus* foi avaliada através da determinação do número de unidades formadoras de colônias no fígado, baço e linfonodos mesentéricos de camundongos selvagens (WT) e deficientes para o receptor ST2 (ST2^{-/-}) em animais não infectados e infectados após 3 e 14 dias de infecção (dados em anexo para 14 dias).

Foi observado que no fígado (**Fig 3A**), e baço (**Fig 3B**), dos animais WT, houve um maior crescimento da *Brucella* comparado com os animais ST2^{-/-} após 3 dias da infecção oral. Em contraste, foi observado um aumento da carga bacteriana da *B. abortus* nos linfonodos mesentéricos dos animais ST2^{-/-} (**Fig 3C**) quando comparados com os animais WT neste mesmo tempo de infecção. Sugerindo que a molécula ST2 é importante no processo de invasão do patógeno, e que as bactérias ficam retidas no linfonodo mesentérico dos animais ST2^{-/-}.

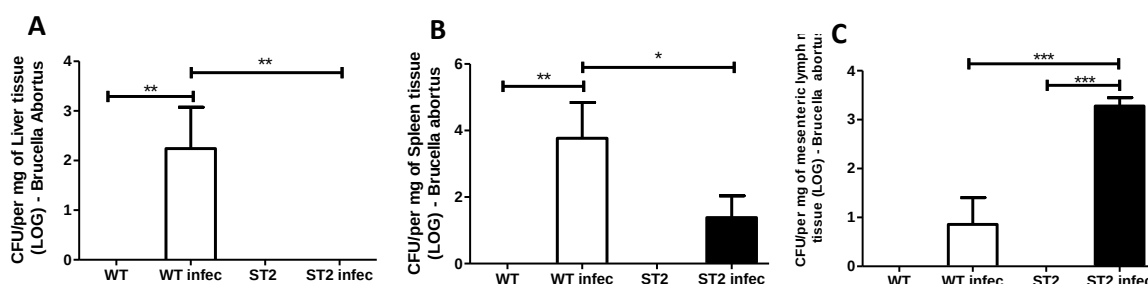


Figura 3: Contagem de CFU no fígado, Baço e linfonodos mesentéricos em camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados por via oral por *Brucella abortus*. Animais WT e deficientes para ST2 foram infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e sacrificados após 3 dias de infecção. O fígado (A), Baço (B) e linfonodos mesentéricos (C) dos animais foram coletados e processados para avaliação do título de Bactérias viáveis através da contagem de CFU. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 3 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

4.2 Avaliação da integridade da barreira epitelial intestinal e de mediadores intestinais em animais WT e ST2^{-/-} antes e após a infecção por via oral por *B. abortus*.

O papel do receptor ST2 na manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal e na regulação de fatores que poderiam levar a alteração da mesma, frente à infecção pela *Brucella*, foi avaliado através do método do fluxo de FITC-labeled dextran (**Fig 4**), da avaliação de transcritos da molécula de Anfirregulina (**Fig 5**) e por meio da dosagem de IL-1 β (**Fig 6A**) e IL-33 (**Fig 6B**) através do método de ELISA em animais WT e ST2^{-/-} após 3 dias de infecção oral pela bactéria.

Observamos que diferentemente do que ocorre nos animais WT, nos quais a infecção leva ao aumento da permeabilidade da barreira epitelial (**Fig 4**) (visto através do aumento de FITC-dextran no soro dos animais), nos animais ST2^{-/-} sua permeabilidade não foi alterada após a infecção, no tempo de infecção avaliado (3 dias).

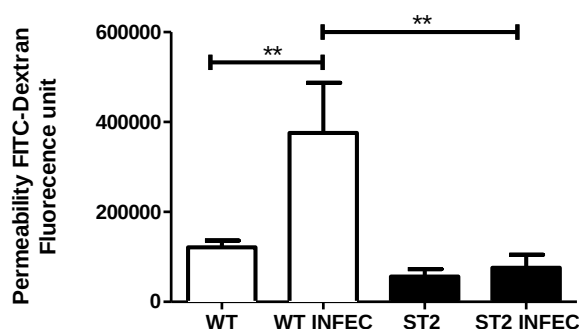


Figura 4: Permeabilidade intestinal em camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados por via oral por *Brucella abortus*. Animais WT e deficientes para ST2 foram infectados, por via oral, por 1×10^9 UFC de *B. abortus* e após 3 dias de infecção foi realizado a avaliação da permeabilidade intestinal. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 1 experimento. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Observamos que referente à expressão de Anfirregulina (AREG) (**Fig 5**), molécula membro da família dos fatores de crescimento epidérmico (EGF), sendo crítica para regeneração epitelial intestinal após lesão, a infecção por *B.abortus* induz aumento da expressão de AREG de forma semelhante em ambos os animais WT e ST2^{-/-}.

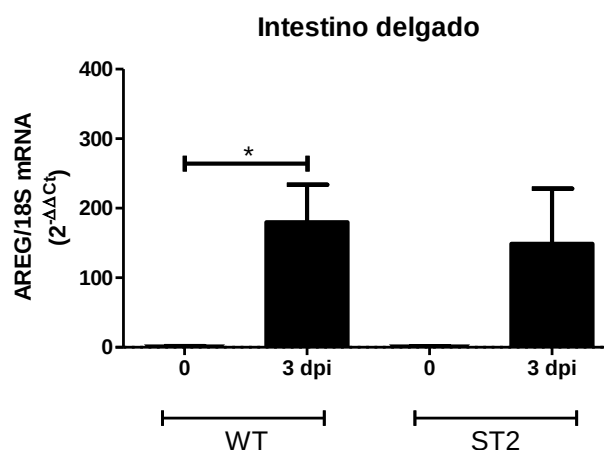


Figura 5: Expressão de transcritos de Anfirregulina (AREG) em intestino delgado de camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados por via oral por *Brucella abortus*. A avaliação da participação de ST2 na regulação da expressão de Anfirregulina após infecção por via oral por *B. abortus* foi realizada através do ensaio de qPCR de cortes do intestino delgado de animais WT e ST2^{-/-} infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e após 3 dias de infecção foi coletado amostras do intestino delgado para processamento conforme descrito. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 1 experimento. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

E com relação à produção de IL-1 β (**Fig 6A**), citocina com papel importante na defesa contra à *Brucella* e também na manutenção do balanço homeostático intestinal e na regeneração do epitélio, e da IL-33 (**Fig 6B**), citocina ligante do ST2, é observado que a infecção por *B.abortus* leva a uma diminuição da produção destas citocinas nos animais WT. Já nos animais nocautes para ST2^{-/-}, a produção destas citocinas já se apresenta naturalmente diminuídas e após a infecção não ocorre alteração deste perfil quando comparado aos animais WT.

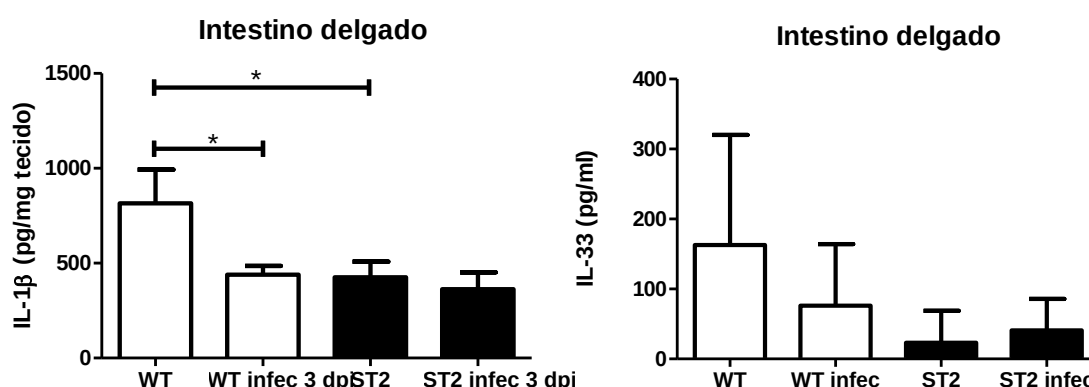


Figura 6: Produção de citocinas no tecido intestinal de camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados por via oral por *Brucella abortus*. Animais WT e ST2^{-/-} infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e após 3 dias de infecção foi coletado amostras do intestino delgado para processamento e avaliação da produção de IL-1 β (A) e IL-33 (B) por ELISA. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 3 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

4.3 Avaliação da expressão dos transcritos de MUC1 e MUC2 antes e após a infecção por via oral por *Brucella abortus* em animais WT e ST2^{-/-}

O papel de ST2 na regulação de fatores envolvidos na composição da barreira intestinal foi investigado através da avaliação da expressão de transcritos das moléculas de Mucina 1 (MUC1) e Mucina 2 (MUC2), importantes na defesa imune intestinal e proteção do epitélio contra danos físicos.

Observamos que a infecção por *B. abortus* induz um aumento da expressão de MUC2 (**Fig 7**) apenas nos animais WT, não havendo alterações da expressão desta molécula antes e após a infecção nos animais ST2^{-/-}, sugerindo a participação do ST2 na regulação transcricional desta molécula. Não houve amplificação de MUC1 nos dois grupos analisados (dados não mostrados).

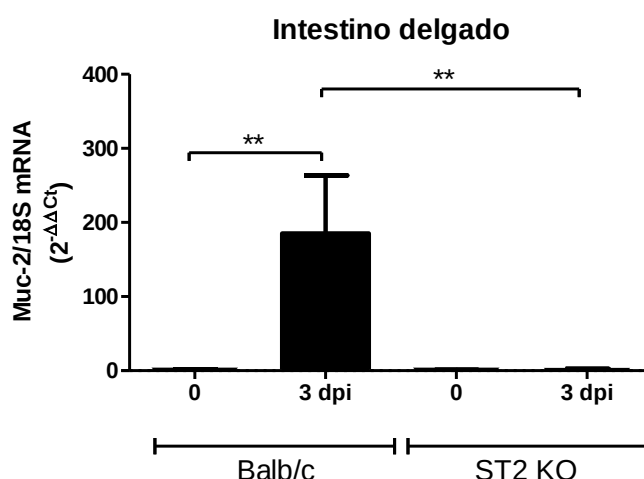


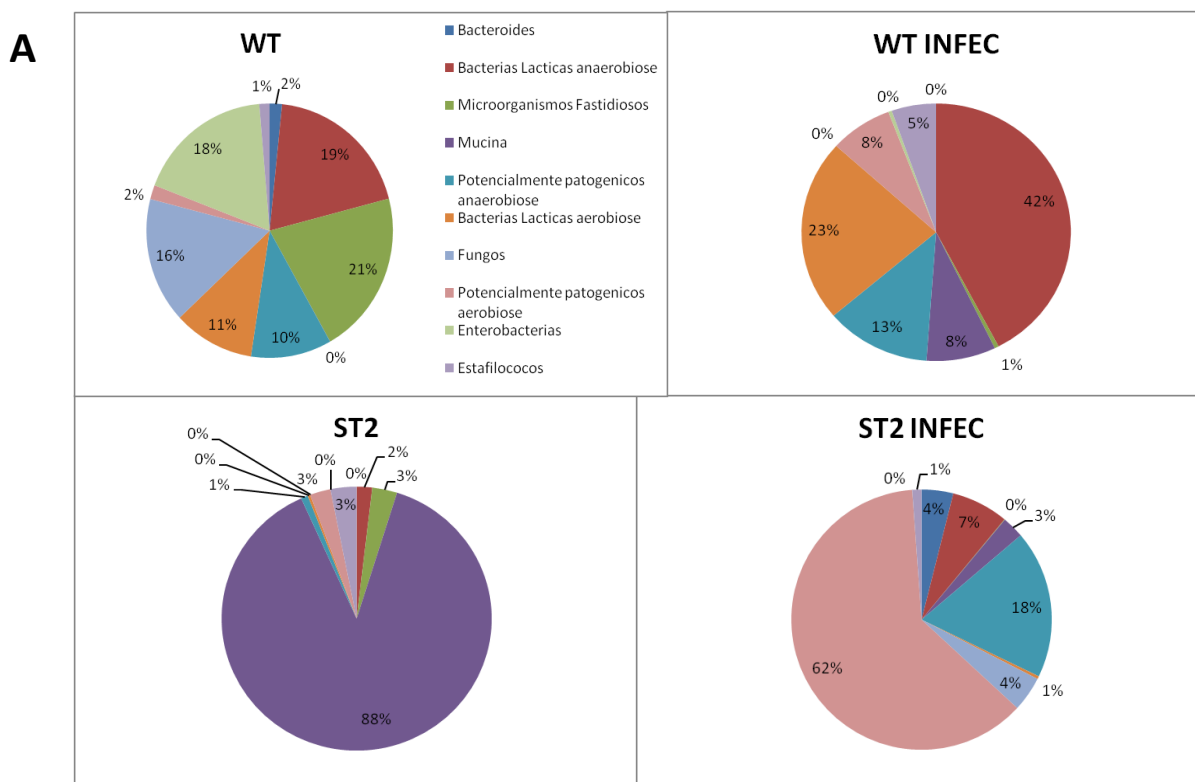
Figura 7 : Expressão de transcritos de MUCINA 2 (MUC2) em intestino delgado de camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados por via oral por *Brucella abortus*. A avaliação da participação de ST2 na regulação da expressão de MUC2 após infecção por via oral por *B. abortus* foi realizada através do ensaio de qPCR de cortes do intestino delgado de animais WT e ST2^{-/-} infectados, por via oral, por 1×10^9 UFC de *B. abortus* e após 3 dias de infecção foi coletado amostras do intestino delgado para processamento conforme descrito . Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 1 experimento. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

4.4 Avaliação do perfil da microbiota intestinal em animais WT e ST2^{-/-} antes e após a infecção por via oral por *B. abortus*.

A fim de investigar se a infecção por *Brucella* é capaz de alterar o perfil bacteriano da microbiota intestinal, animais WT e ST2^{-/-} foram infectados com *B. abortus* via oral, e foi realizada a coleta representativa de todo o conteúdo intestinal dos animais não infectados e infectados, para as análises de cultivo meio-independente.

De maneira qualitativa (**Fig 8 A**), foi observado que o perfil da microbiota dos animais WT possuem uma diversidade bem distribuída de grupos de bactérias que compõem seu microbioma, com baixa predominância de enterobactérias. E após a infecção, é observado que ocorre uma elevação na taxa de bactérias lácticas e de enterobactérias. Nos animais nocautes para ST2, é observado que estes animais naturalmente possuem uma diversidade menor dos grupos bacterianos que colonizam o intestino, apresentando maior predominância de bactérias que degradam muco, visto pelo maior crescimento de bactérias no meio enriquecido com mucina. Após a infecção oral com *Brucella*, o perfil da microbiota é totalmente alterado, apresentando predominância de grupos bacterianos considerados patobiontes, como exemplo *Proteobacteria* e a família *Enterobacteriaceae*, que contem membros como *Escherichia coli*, *Shigella* e *Klebsiella*, que já foram relatados como os grupos mais frequentes de patobiontes a se expandirem na disbiose (Lupp *et al.* , 2007).

Numa análise quantitativa (**Fig 8B**), é observado que nos animais WT infectados com *Ba* ocorre um aumento no numero de bactérias, porem não houve alterações significativas na diversidade que compõe o seu microbioma no intestino. Entretanto, nos animais nocaute infectados com *Ba*, não houve aumento do numero total de bactérias, porem a diversidade bacteriana foi significativamente alterada.



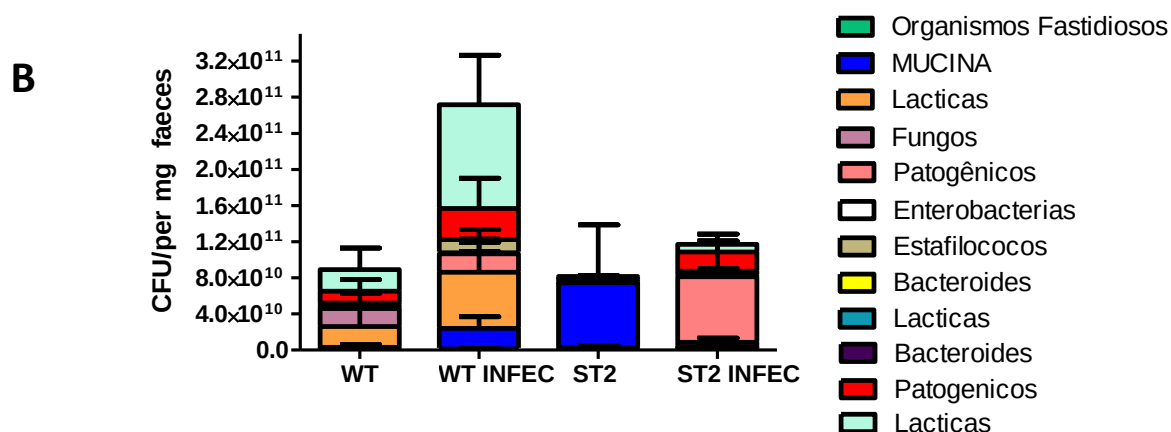


Figura 8: Perfil da microbiota intestinal qualitativo (A) e quantitativo (B) cultivável de camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados por via oral por *Brucella abortus*. Animais WT e ST2^{-/-} infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e após 3 dias de infecção foi realizado coleta do conteúdo intestinal e as amostras foram processadas e cultivadas nos meios: Ágar Sal Manitol — para isolamento de Estafilococos —; Ágar MacConkey (MAC) — seletivo para Enterobactérias —; Ágar Brain Heart Infusion (BHI) com Azida Sódica — isolamento de Enterococos —; Ágar Sangue — Base rica, fornece condições de crescimento para diversos microrganismos inclusive *Streptococcus* spp.—; Ágar MRS Lactobacilos — cultivo de Lactobacilos e Bifidobactérias —; Bacteroides Bile Esculina (BBE) — cultivo de *Bacteroides*; Sabourand + Cloranfenicol — cultivo de fungos patogênicos e leveduras e Meio rico em MUCINA. As placas foram incubadas na presença ou ausência de oxigênio, à 37°C, e a contagem de UFC foi realizada 3-4 dias após o plaqueamento. Os resultados foram expressos como a média de UFC por miligrama de fezes.

4.5 Avaliação do perfil celular intestinal antes e após a infecção por via oral por *B.abortus* em animais WT e ST2^{-/-}

A fim de investigar se a resposta inflamatória poderia ser um dos fatores envolvidos no fenótipo observado entre os grupos frente a infecção por *B.abortus*, foi avaliado o perfil de células da imunidade inata (neutrófilos (**Fig 9A**) e eosinófilos (**Fig 9B**) por meio indireto dos ensaios enzimáticos de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO).

Após a infecção por *Brucella*, ocorre um aumento no acúmulo de neutrófilos (**Fig 9A**) e eosinófilos (**Fig 9B**) nos animais WT, o que não foi observado nos animais ST2^{-/-} infectados. Entretanto, quando comparamos os animais WT e ST2^{-/-} infectados observamos uma redução de neutrófilos e eosinófilos recrutados, demonstrando que a ausência do receptor ST2 de alguma forma modula o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos após à infecção.

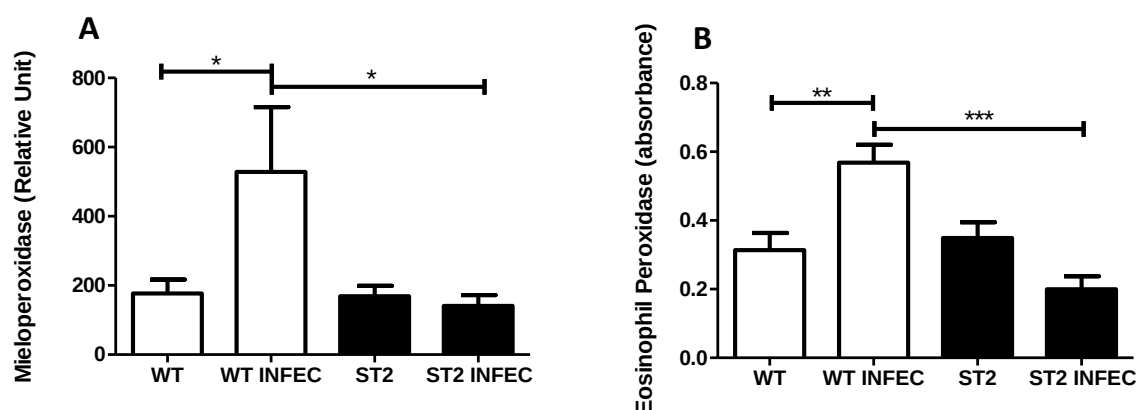


Figura 9: Perfil celular intestinal em camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados por via oral por *Brucella abortus*. Animais WT e ST2^{-/-} infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e após 3 dias de infecção foi coletado amostras do intestino delgado para processamento e avaliação de Neutrófilos (A) e Eosinófilos (B) . Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 3 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

4.6 Avaliação da produção de citocinas no tecido intestinal de animais WT e ST2^{-/-} antes e após a infecção por via oral por *B. abortus*.

A avaliação da participação do ST2 na produção de citocinas (**Fig 10**) envolvidas na resposta imune intestinal IFN- γ (A), IL-6 (B), TNF- α (C), IL-10 (D) e IL-13 (E) foi realizada a partir de fragmentos do intestino delgado, de animais não infectados e infectados após 3 dias de infecção.

Quando comparamos os resultados da produção de citocinas dos animais nocautes para o receptor ST2 com os animais WT, ambos infectados, nos leva a concluir que a infecção por *Ba* induz o aumento da produção de IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-13. Esse perfil pro-inflamatório detectado nos animais ST2^{-/-} pode estar relacionado a uma redução da carga bacteriana observado no baço e fígado desses animais. Ademais, observamos que a infecção por *Brucella* induziu a diminuição da produção de IL-6, IL-10 e IL-13 no intestino dos animais WT após a infecção. Com relação às citocinas IFN- γ e TNF- α , a sua secreção não foi alterada nestes animais.

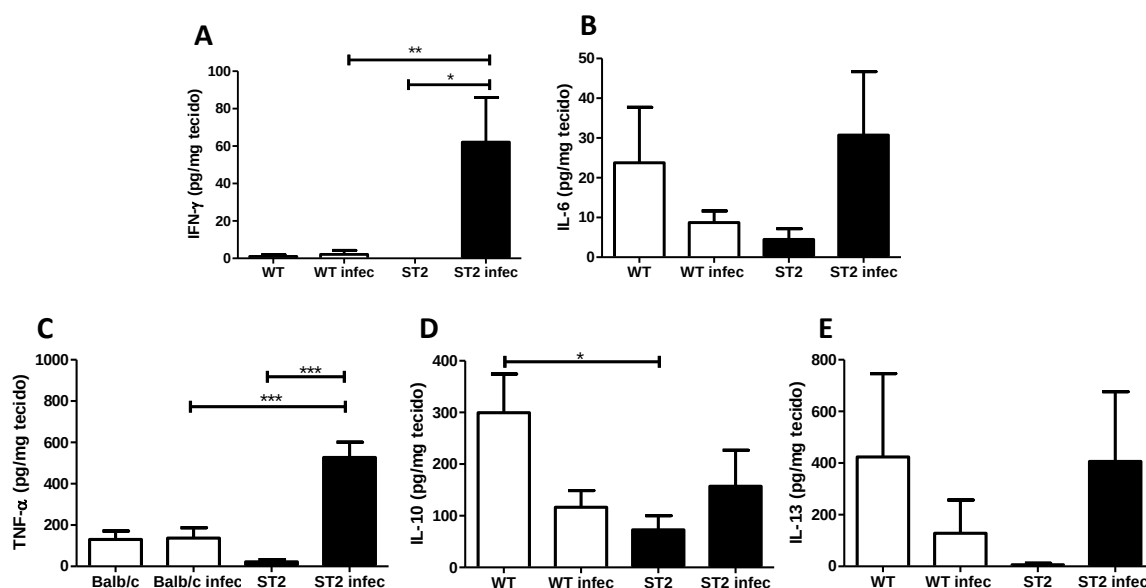


Figura 10: Produção de citocinas no intestino delgado em camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados por via oral por *Brucella abortus*. Animais WT e ST2^{-/-} infectados, por via oral, por 1x10⁹ UFC de *B. abortus* e após 3 dias de infecção foi coletado amostras do intestino delgado para processamento e avaliação de produção de IFN-γ (A), IL-6 (B), TNF-α (C), IL-10 (D) e IL-13 (E) pelo método de ELISA. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 3 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Quais fatores estão envolvidos no controle da B.abortus, após a infecção por via intraperitoneal?

4.7 Avaliação da susceptibilidade *in vivo* e do perfil celular após infecção sistêmica por *Brucella abortus* em camundongos WT versus ST2^{-/-}

A susceptibilidade à infecção sistêmica (**Fig 11**) por *Brucella abortus* foi avaliado através da determinação do numero de unidades formadoras de colônias no fígado, baço e linfonodos mesentéricos de camundongos selvagens (WT) e deficientes para o receptor ST2 (ST2^{-/-}), após 3 dias de infecção. Adicionalmente, foi realizada a contagem total de leucócitos circulantes no sangue dos animais de ambos os grupos para avaliação da inflamação sistêmica.

Foi observado que a carga bacteriana é igual no fígado (A) e baço (B) dos animais WT e ST2^{-/-}, após à infecção via intraperitoneal. E de forma instigante, é observado um aumento da replicação da *B.abortus* nos linfonodos mesentéricos (C) dos animais ST2^{-/-}, como observado na infecção via oral. Com relação à contagem de leucócitos totais circulantes (D),

é observado que a contagem de células diminui após a infecção em ambos os grupos de animais analisados.

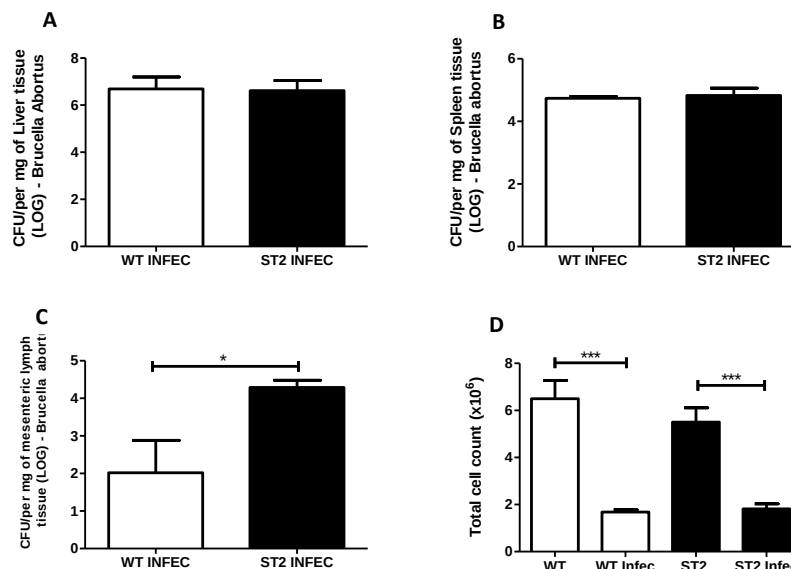


Figura 11: Contagem de CFU no fígado, Baço e linfonodos mesentéricos e contagem total de leucócitos circulantes em camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e infectados sistemicamente por *Brucella abortus*. Animais WT e deficientes para ST2 foram infectados, por via intraperitoneal, por 1×10^7 UFC de *B. abortus* e sacrificados após 3 dias de infecção. O fígado (A), Baço (B) e linfonodos mesentéricos (C) dos animais foram coletados e processados para avaliação do título de Bactérias viáveis através da contagem de CFU. O sangue periférico foi coletado para contagem total de leucócitos circulantes (D). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 3 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.8 Avaliação da produção de citocinas e da população de células T regulatórias em cultura de esplenócitos em animais WT e ST2^{-/-} antes e após a infecção sistêmica por *B. abortus*.

Visando realizar a análise de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios durante a infecção sistêmica, foi a avaliação de população de células T reguladoras (**Fig 12**) CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺, e a produção de IFN- γ por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em esplenócitos, após a infecção via sistêmica nos animais WT e ST2^{-/-}, através da técnica de citometria de fluxo.

Com relação a análise de células TCD4⁺, é observado que a infecção sistêmica por *Brucella* induz a diminuição de células T CD3⁺CD4⁺ (A) em ambos os grupos, mas com relação aos animais nocautes, a infecção induz a proliferação de células T CD3⁺CD4⁺ expressando FoxP3 (B), linfócitos T reguladores. Com relação aos linfócitos T, é observado que a infecção sistêmica induz diminuição da porcentagem de células T CD4⁺ (C) em ambos os grupos analisados, mas a produção de IFN- γ (D) é maior após a infecção nos animais WT.

Com relação às células T CD8⁺ (E), a infecção pela *Brucella* também reduz a porcentagem dessas células, apresentando níveis de IFN- γ semelhantes em ambos os animais (F).

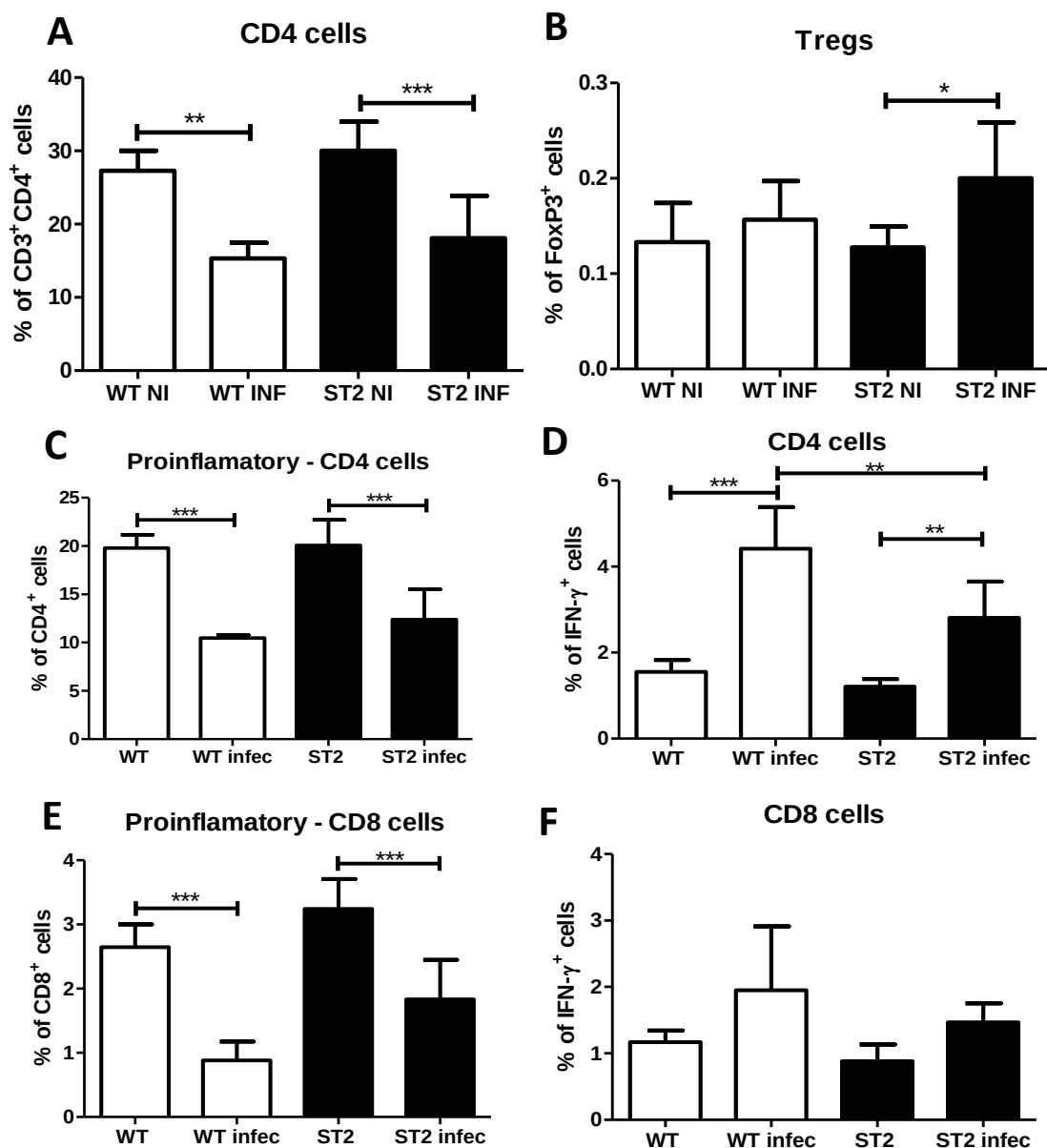


Figura 12: Produção de citocinas e avaliação da população de células T regulatórias e TCD4⁺ e CD8⁺ em cultura de esplenócitos em camundongos WT versus ST2^{-/-} infectados sistemicamente por *Brucella abortus*. Animais WT e deficientes para ST2 foram infectados, por via intraperitoneal, por 1x10⁷ UFC de *B. abortus* e sacrificados após 14 dias de infecção. Baço foi coletado para realização de cultura de esplenócitos. Porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺ (A), porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺ expressando FoxP3 (B), porcentagem de células TCD4⁺ (C). Porcentagem de células TCD4⁺, produzindo IFN- γ (D), porcentagem de células TCD8⁺ (E) Porcentagem de células TCD8⁺ produzindo IFN- γ (F). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 1 experimento. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.9 Avaliação da capacidade produtora de óxido nítrico de macrófagos de animais WT e ST2^{-/-}

Para avaliar se a capacidade de produção de óxido nítrico (NO) dos macrófagos de animais WT e ST2^{-/-}, e correlacionar com a potencial atividade microbicida, foi realizado o ensaio de medição de óxido nítrico no sobrenadante de BMDMs.

É observado que a produção de NO em macrófagos de ambos os animais é similar quando estimulados com *Brucella* ou LPS, na presença ou ausência de IFN- γ (**Fig 13**).

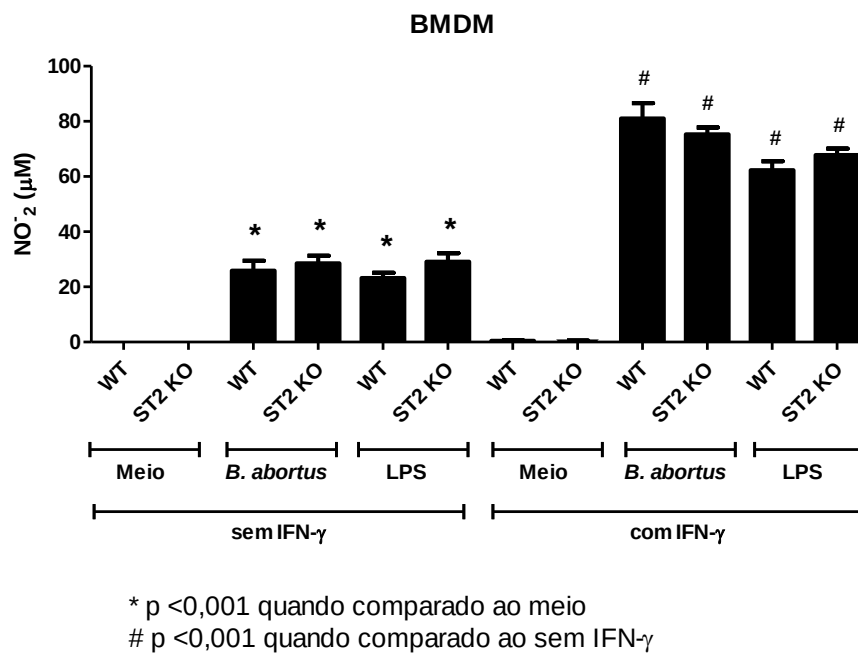


Figura 13: Produção de Óxido Nítrico em macrófagos derivados da medula óssea em camundongos WT versus ST2^{-/-}. Foi realizada derivação de Macrófagos da medula óssea de animais WT e deficientes para ST2 e realizado estimulação com *Brucella abortus* e LPS na presença ou ausência de IFN- γ . O sobrenadante foi coletado para realização do ensaio já descrito. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 1 experimento. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

5. DISCUSSÃO

As infecções causadas pelo gênero *Brucella spp* no homem e nos animais são transmitidas principalmente pela via oral. Poucos são os estudos que abordam o trato gastrointestinal procurando esclarecer os mecanismos de invasão da bactéria durante a brucelose (Bandara et al., 2007; Delpino et al., 2007; Izadjoo et al., 2008; Paixao et al., 2009; Pasquali et al., 2003; Sangari et al., 2007). Neste trabalho os principais achados foram: 1) a infecção por *Brucella abortus* induziu quebra da homeostase intestinal levando a disbiose da microbiota comensal nos animais selvagens, e 2) animais deficientes para ST2 foram mais resistentes à infecção por *B.abortus*, sugerindo que ST2 possa regular negativamente a invasão da *Brucella* no início da infecção e esse efeito pode estar associado à modulação da microbiota.

Apesar de a *Brucella abortus* possuir diversos mecanismos estratégicos para evasão da resposta imune e posterior replicação (Guzman-Verri et al., 2002; Hong et al., 2000; Ko and Splitter, 2003; Sangari and Agüero, 1996; Seleem et al., 2010), as células da imunidade inata do hospedeiro são equipadas com diversas moléculas que interagem direta ou indiretamente com a bactéria a fim de controlar a infecção. Utilizando macrófagos e células dendríticas como modelo, receptores do tipo Toll como TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9 e os receptores NOD1 e NOD2, por exemplo, foram mostrados como responsáveis pelo reconhecimento da *B. abortus* (Gomes et al., 2012; Gomes et al., 2013; Gomes et al., 2016; Macedo et al., 2008; Oliveira et al., 2012).

Recentemente, diversos mecanismos da imunidade inata vêm demonstrando possuir papel importante na modulação da homeostase intestinal (Garrett et al., 2010; Maloy and Powrie, 2011; Renz et al., 2011). Nesse contexto, a desregulação da sinalização de ST2/IL-33 foram implicadas em uma variedade de doenças inflamatórias como doença inflamatória intestinal (DII) (Beltran CJ, Nunez LE, Diaz-Jimeez D, et al., 2010), doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) e rejeição de transplante de intestino delgado (Vander Lugt MT, Braun TM, Hanash S et al., 2013).

Como grande parte dos estudos focam no papel das células inflamatórias no processo de infecção por *Brucella* por via intraperitoneal, ainda não foram explorados os mecanismos que relacionam a brucelose a fatores envolvidos com a imunidade intestinal como a barreira epitelial, barreira da mucosa e células inflamatórias imunes bem como seus receptores, envolvidas na resposta da mucosa intestinal, os quais podem estar envolvidas no reconhecimento e processo de invasão da bactéria. Dentre os receptores da imunidade inata

já descritos na literatura como importantes no processo de manutenção da barreira e homeostase intestinal, o receptor ST2 foi alvo deste trabalho.

Quando as células de defesa do TGI falham na captura de microorganismos ou seus metabólitos são translocados, esses são drenados principalmente pela veia porta para o fígado (Brenchley e Douek, 2012). Consoante a isso, estudos anteriores mostraram que em infecções bacterianas, maiores concentrações de LPS são detectadas na veia porta quando comparada a outras veias hepáticas ou periféricas e, de forma interessante, bactérias podem ser cultivadas mesmo a partir de explantes de fígados saudáveis (Lumsden et al., 1988; Singh et al., 2011). O fenótipo de resistência exibido pelos camundongos deficientes para ST2 no fígado e baço na infecção oral foi perdido ao realizarmos a infecção intraperitoneal. Estes órgãos apresentaram o mesmo perfil bacteriano em ambos os animais nas infecções de 3 e 14 dias (14 dias, dados suplementares FIG16). Considerando que a veia porta seja a principal rota de entrada sistêmica da *Brucella* vinda do intestino, acreditamos que o fígado possa refletir o resultado da resposta intestinal inicial numa infecção oral, onde maiores quantidades de *Brucella* poderiam estar sendo drenadas por este órgão e consequentemente, diminuindo sua capacidade de disseminar sistemicamente. Os linfonodos mesentérico que drenam o intestino representam um importante local de ativação e diferenciação linfocitária para os intestinos delgado e grosso (D. Esterhazy et al., 2018; Izcue et al., 2009). A compartimentalização aumentada nos linfonodos mesentérico dos animais ST2^{-/-} infectados com a *Brucella* poderia estar ocorrendo através da fagocitose da bactéria por células dendríticas migratórias, pois, é descrito na literatura que elas migram continuamente através dos vasos linfáticos que drenam o intestino para os linfonodos mesentéricos, onde estas células apresentam antígenos derivados do intestino para células T CD4⁺ (Diehl et al., 2013; D. Esterhazy et al., 2016) no intuito de instruí-las a diferenciá-las em células Treg FoxP3⁺ imunossupressoras ou células T *helper* pró-inflamatórias (Th), favorecendo a sobrevivência da *B. abortus* e evitando que ela seja drenada para o fígado.

As células T reguladoras desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase imunológica e na supressão de uma resposta imune exacerbada. Uma variedade de células Treg pode ser induzida sob influência do microambiente tecidual e de citocinas (Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ, 2009), no entanto, o fenótipo das Treg e seus mecanismos supressores diferem dependendo de configurações particulares do tecido e da doença estudada (Cretney E, Kallies A, Nutt SL, 2013). Por exemplo, certos subconjuntos de células Treg, especificamente aqueles no tecido adiposo e nos intestinos, expressam quantidades elevadas do receptor ST2, e requerem IL-33 para sua manutenção e função supressora

(Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM, 2015). A infecção sistêmica por *B.abortus*, induz a proliferação de células T regulatórias expressando FOXP3 nos animais ST2^{-/-} quando comparados ao animal WT. A análise da população de células T por citometria de fluxo indica a diminuição de células TCD4⁺ e TCD8⁺ após infecção nos animais, que corrobora com os dados de contagem total de leucócitos circulantes, além de indicar que a produção de IFN- γ pelos linfócitos TCD4⁺ é maior nos animais WT quando comparados ao ST2^{-/-}. Apesar do perfil de infecção sistêmica ser semelhante em ambos os animais analisados e o perfil de ativação de resposta envolvendo Tregs ser diferente no WT e ST2^{-/-}, estes dados sugerem que a ausência de ST2 possa estar afetando outros componentes imunológicos, e que possam existir outros mecanismos de ativação de Tregs envolvidos, que necessitam de mais investigações.

Visando explorar o papel do ST2 na manutenção da integridade epitelial intestinal, nossos resultados demonstraram que a infecção *in vivo* por *B. abortus* nos animais selvagens levou ao aumento da permeabilidade intestinal, sugerindo que a quebra da barreira epitelial poderia ser um dos mecanismos que facilitaria a entrada do patógeno. Outros trabalhos na literatura, utilizando modelo de infecção *ex vivo* na alça ileal do intestino, mostraram que a migração de *Brucella* através do epitélio intestinal ocorre a partir da sua endocitose pelo epitélio associado ao folículo (EAF) nas placas de Peyer ou por sua captação pelas células dendríticas penetrantes do EAF (Ackermann et al., 1988; Nakato et al., 2012). Adicionalmente, Rossetti e colaboradores (2013) observaram, através de análises por *microarray*, que duas vias relacionadas a barreira epitelial intestinal foram reprimidas durante a fase inicial de infecção por *Brucella*, sugerindo a subversão da função da barreira e facilitação da migração transepitelial. Dessa forma, uma variedade de patógenos utiliza como mecanismo de invasão moléculas-alvo envolvidas na adesão celular, como por exemplo, a bactéria *Helicobacter pylori* a qual seu sistema de secreção do tipo 4 injeta um de seus efetores (CagA) na célula hospedeira modificando diversos processos e culminando na ruptura da barreira epitelial e na invasão da bactéria (Churin et al., 2003). Apesar de não termos investigado neste modelo a infecção direta da *Brucella* em células epiteliais intestinais, a infecção levou ao aumento da permeabilidade nos animais WT, e esta alteração pode estar relacionada à presença do receptor ST2, já que nos animais nocautes, não foi observada alteração da permeabilidade intestinal após infecção por *Ba*.

Outro mecanismo envolvido no processo de manutenção da barreira epitelial, Anfirregulina (membro da família dos fatores de crescimento epidérmico-EGF), é muito relacionada com a regeneração epitelial intestinal após lesão (Shao and Sheng, 2010) e possui papel, mesmo

que controverso, na proliferação celular (Shoyab, McDonald *et al.*, 1988). Foi observado neste trabalho, que a infecção por *Brucella* levou ao aumento da expressão de transcritos dessa molécula em ambos os animais analisados. O que sugere que a alteração da permeabilidade intestinal observada nos animais WT não seja mediada pela participação do ST2 na regulação transcricional de Anfirregulina e alteração celular do epitélio.

A citocina pró-inflamatória IL-1 β , secretada a partir da ativação de inflamassomas possuindo importante papel na defesa contra patógenos, e também, na manutenção do balanço homeostático intestinal e na regeneração do epitélio (Rathinam e Chan, 2018) (Elinav, Henao-Mejia *et al.*, 2013). Altos níveis de IL-1 β são encontrados na mucosa intestinal em estado normal (*steady-state*), implicando sua importância na manutenção da barreira da mucosa e no monitoramento imune. Os dados desta citocina corroboram com os dados de alteração da permeabilidade intestinal induzida pela *Brucella* observado nos animais WT, sugerindo que o ST2 possua papel regulador desta citocina e consequentemente, papel na manutenção da permeabilidade intestinal.

Vários estudos têm proposto que a lesão celular ou a morte são os mecanismos dominantes pelos quais a IL-33 atinge o ambiente extracelular, de modo que, em um estado estacionário, a IL-33 não é ativamente secretada pelas células (Martin NT, Martin UM, 2016; Camilleri M, Madsen K, Spiller R, *et al.*, 2012). No entanto, como a IL-33 é expressa constitutivamente pelas células endoteliais e epiteliais, a IL-33 está imediatamente disponível para o microambiente extracelular secundário à lesão celular e à necrose (Lefrancais E, Cayrol C, 2012). Como tal, a IL-33 é um importante ferramenta para o sistema imunológico quando há uma violação na integridade da mucosa secundária a danos nas células epiteliais (Camilleri M, Madsen K, Spiller R, *et al.*, 2012). Observamos que a produção desta citocina no intestino delgado é maior nos animais WT e naturalmente diminuída nos animais ST2^{-/-}. Estes dados corroboram com os dados de expressão de transcritos de AREG, sugerindo, que a alteração da permeabilidade intestinal induzida pela infecção por *Brucella*, não seja através de dano tecidual, e sim por outros mecanismos que necessitam ser investigados.

A imunidade nas superfícies mucosas é notável pela presença de bactérias comensais (Oh JE, Kim BC, Chang DH, *et al.*, 2016). No intestino, o microbioma foi estabelecido como sendo um mediador significativo do metabolismo e da inflamação local (Belkaid Y, Hand TW, 2014; Belkaid Y, Harrison OJ, 2017; Thaïss CA, Zmora N, Levy M, *et al.*, 2016; Van den Elsen LW, Poyntz HC, Weyrich LS, *et al.*, 2017; Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E, 2017). Não existe na literatura dados descrevendo se o receptor ST2 possui um

papel regulador da microbiota. Através dos resultados obtidos neste trabalho, sugerimos que a infecção por *B. abortus* nos animais selvagens leva ao desequilíbrio da microbiota comensal. Esse desequilíbrio gera disbiose, com aumento de grupos bacterianos considerados potencialmente patogênicos. Acreditamos que a disbiose observada seja um dos fatores que possa favorecer a quebra da barreira epitelial permitindo maior passagem da *Brucella* para órgãos sistêmicos. Por outro lado, a infecção nos camundongos ST2^{-/-} não acarretou alteração de permeabilidade intestinal e os animais mostraram menos susceptíveis à infecção (em relação ao WT), sugerindo que a presença de ST2 está associada à manutenção da composição microbiana comensal e consequentemente, na regulação da integridade epitelial e da carga bacteriana. Considerando que os animais deficientes para ST2 já possuam “naturalmente” uma microbiota disbiótica, acreditamos que outro mecanismo envolvido no controle da infecção já sugerido na literatura, seja a competição entre a microbiota de animais ST2 e *B. abortus* levando, por exemplo, a possível interação entre os microrganismos e produção de metabólitos capazes de eliminar o patógeno. Muitas bactérias comensais inibem diretamente os patógenos competindo por nutrientes ou induzindo a produção de substâncias inibitórias, por exemplo, os *Bacteroides thuringiensis*, são capazes de secretar uma bacteriocina *thuricin CD*, que age diretamente em Bacilli, Clostridia formadores de esporos e *C. difficile* (Rea et al., 2010), e *Enterococcus faecium* e *Pediococcus pentosaceus* produzem bacteriocina anti-*Listeria* (Chanos and Williams, 2011; Pinto et al., 2009).

Assim, apesar de não termos explorado esse mecanismo neste trabalho, dados da literatura nos permite sugerir que possa existir um mecanismo de competição da microbiota disbiótica de animais ST2^{-/-} e seus patobiontes *versus B. abortus*. A microbiota também poderia estar auxiliando a presença da *Brucella* nos linfonodos mesentéricos observado nos animais nocautes. Utilizando um modelo de infecção oral com *Salmonella Typhimurium*, Gretchen E. Diehl e colaboradores (2013) mostraram que num estado basal, a microbiota inibe o transporte de bactérias comensais e patogênicas do lúmen para o linfonodo mesentérico. No entanto, sob condições de disbiose induzida por antibióticos, é observada a presença de bactérias nos linfonodos, onde este transporte foi realizado por fagócitos mononucleares. Dessa forma, sugerimos que o microbioma disbiótico dos animais nocautes também pode estar favorecendo a sobrevivência e permanência da *Brucella* nos linfonodos mesentéricos.

Neutrófilos e Eosinófilos podem atuar como células efetoras liberando grânulos tóxicos diretamente no patógeno, mas, também, tem papel importante nas respostas imunes

específicas à antígenos do trato gastrointestinal (TGI) agindo como célula apresentadora de antígeno ou mesmo potencializando a inflamação através da liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que podem modular o sistema de adesão do TGI, o tráfico de leucócitos, a remodelação tecidual e os estados de ativação celular (Hogan et al., 2013). Neste trabalho, demonstramos que a infecção por *B.abortus* leva ao aumento de eosinófilos e neutrófilos no intestino nos animais WT. O que pode contribuir para o estabelecimento da infecção sistêmica numa infecção oral, visto que *Brucella abortus* é um patógeno intracelular, e como já descrito na literatura, neutrófilos infectados com *Brucella* são prontamente fagocitados pelos macrófagos, e se replicam extensivamente dentro dos macrófagos. Os neutrófilos então acabam servindo como veículos de “cavalo de Troia” para uma eficiente dispersão bacteriana, replicação intracelular e estabelecimento de infecções crônicas (Gutierrez-Jimenez et al., 2019). Já nos animais ST2^{-/-}, os granulócitos estão naturalmente reduzidos e este perfil celular não é alterado após a infecção como observado pelos ensaios de EPO e MPO. Sugerindo que esses fatores podem estar associados ao fenótipo de resistência inicial exibido por esses animais. Contudo, na infecção por *Ba* pela via sistêmica, a contagem total de leucócitos circulantes diminui de forma semelhante em ambos os animais analisados, sugerindo que a *Brucella* atue modulando a inflamação sistêmica, favorecendo sua invasão e sobrevivência nos órgãos atingidos.

Durante as infecções, dependendo do órgão envolvido, a sinalização IL-33/ST2 pode induzir a resposta imune necessária para controlar os focos infecciosos, podendo ser uma resposta do tipo Th1 ou Th2 (Liew FY, Girard JP, Turnquist HR, 2016). Em um modelo de sepse por *S. aureus*, a deficiência de ST2 alterou o equilíbrio imunológico para uma resposta imune do tipo Th1, que contribuiu para eliminar a infecção devido ao efeito microbicida aumentado via produção de NO por neutrófilos e macrófagos além de levar a expressão de IFN- γ e aumentar a fagocitose por macrófagos (Staurengo-Ferrari L, Trevelin SC, Fattori V. et al., 2018).

A produção de citocinas no intestino delgado mostram que após a infecção por *Brucella* a produção de IL-10 (citocina que possui papel supressor das respostas inflamatórias inatas e adaptativas e estimulador de circuitos regulatórios (Kole e Maloy, 2014), IL-13 (envolvida na resposta imune do tipo Th2 e supostamente implicada em alguns distúrbios intestinais (Giuffrida P, Caprioli F, Faccioli F et al., 2019) e IL-6 apresentaram-se diminuídas após a infecção nos animais WT. Em contraste, o aumento de IFN- γ e de citocinas pró-inflamatórias pode estar associado com uma maior defesa do intestino contra a invasão da *B.abortus*, o que pode estar contribuindo para o fenótipo de maior resistência observado nos animais

ST2^{-/-}. Sugerindo a participação de ST2 na modulação da resposta imune inflamatória frente a um estímulo infeccioso.

O muco intestinal é um dos principais componentes de defesa contra invasão de patógenos e protege o epitélio contra danos físicos. Curiosamente, ST2 parece ter um papel importante na manutenção da barreira epitelial dependente de muco, uma vez que camundongos ST2^{-/-} mostraram diminuição na expressão de MUC2, ao contrario do observado nos animais WT. Acreditamos que a expressão aumentada de MUC2 nos animais WT após a infecção, possa estar ligada a disbiose observada. O aumento da expressão de MUC2 e da permeabilidade intestinal após a infecção poderia estar auxiliando a invasão da *Brucella*, atingindo assim órgãos sistêmicos. Por outro lado, a infecção por *B. abortus* nos animais ST2^{-/-} não causou alteração nos níveis de expressão dos transcritos de mucina. Vale destacar, que os animais deficientes para o receptor ST2 apresentam predominância de bactérias mucolíticas na sua microbiota disbiótica “natural”. Trabalhos na literatura mostram que a microbiota comensal tem papel regulador na produção de mucinas intestinais e que, no estado de disbiose, ocorre um aumento de até 100 vezes na quantidade de bactérias mucolíticas (que tem habilidade de degradar mucinas) da microbiota comprometendo a função de barreira do epitélio intestinal (McCabe and Parameswaran, 2017). Sugerindo assim, que nos animais nocautes para ST2, a presença da disbiose e a produção de muco não são os principais fatores envolvidos no fenótipo de permeabilidade observado nestes animais, e que outros fatores estejam envolvidos nas barreiras intestinais dos animais ST2^{-/-}.

A ausência de ST2 aumentou a atividade bactericida de neutrófilos e macrófagos contra *Staphylococcus aureus* em um modelo de sepse (Staurengo-Ferrari L, Trevelin SC, Fattori V, et al. 2018) através do aumento da produção de óxido nítrico por estas células. Dessa forma, procuramos investigar se num cenário *in vitro*, se os macrófagos estariam apresentando maior produção de NO contra a infecção por *Brucella*. Nós observamos que a taxa de produção de óxido nítrico ocorre de forma similar nos animais WT e ST2^{-/-} seja com a estimulação com a *B.abortus* ou LPS, na presença ou ausência de IFN-γ. Sugerindo que os macrófagos derivados da medula óssea apresentam mesmo potencial microbicida, e que o ST2 no contexto da infecção por *B.abortus* não está envolvido na regulação de produção de NO por estas células.

Em resumo, os trabalhos na literatura revelam que o receptor ST2 possui diversas funções, induzindo respostas de maneira específica para cada tipo celular e contexto em que esta inserida. Isso é facilmente observado nos dados obtidos nesse trabalho, nos quais o

contexto em que ST2 esta ou não inserido altera diretamente o resultado da resposta do hospedeiro frente à infecção por *Brucella*. Portanto, entendemos que como um possível alvo terapêutico, o receptor ST2 não deve ser visto como um mecanismo isolado, já que a microbiota do hospedeiro parece ser importante assim como o seu papel na barreira epitelial. Dessa forma uma estratégia terapêutica interessante consiste de mecanismos que inibam a função do ST2 juntamente com a regulação da microbiota comensal.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a infecção oral por *Brucella abortus* altera a homeostase intestinal em favorecimento a sua invasão e estabelecimento da infecção sistêmica, e um dos mecanismos envolvidos nesse processo é parcialmente dependente do receptor ST2. O receptor ST2 mostrou-se importante na manutenção da barreira epitelial e na regulação negativa da resposta imune inflamatória frente à infecção por via oral pela *B.abortus*.

7. MODELO

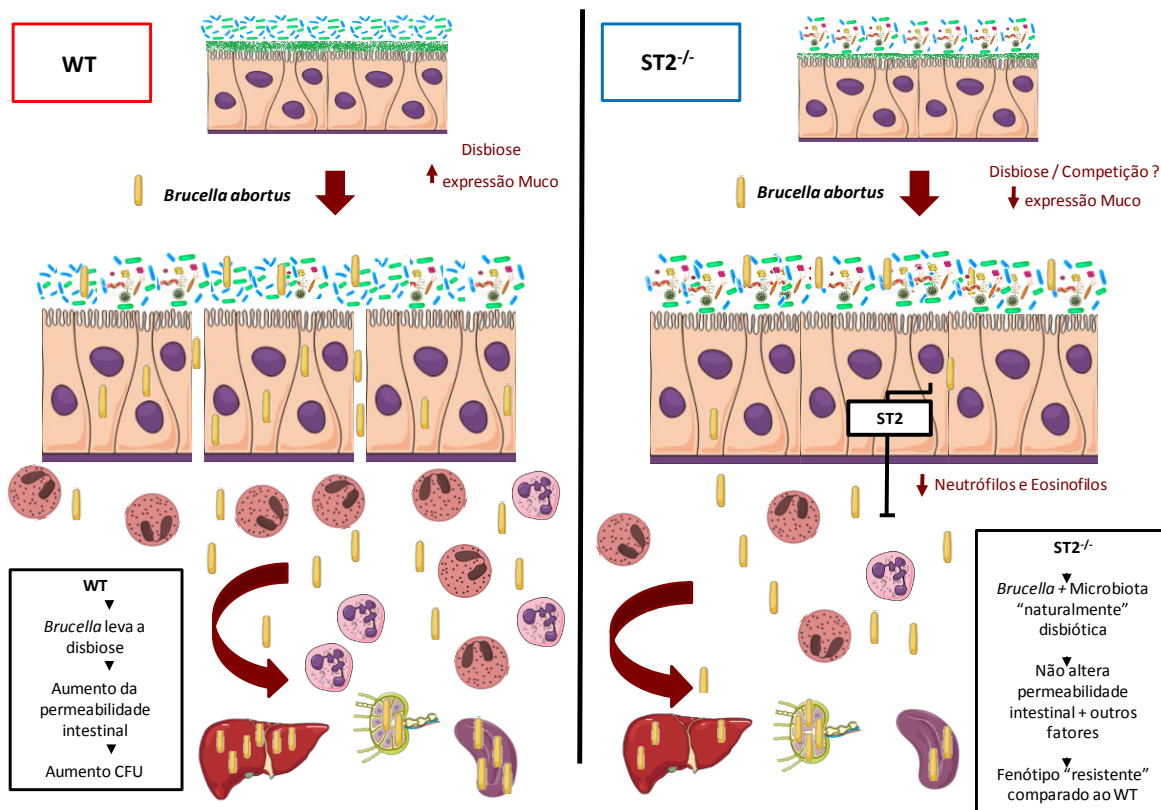


FIGURA 14: Modelo da resposta à infecção oral por *B. abortus* em animais WT versus ST2^{-/-}. Como panorama geral, acreditamos que a infecção por *Brucella abortus* em animais WT (à esquerda) leva a disbiose da microbiota comensal com consequente aumento da permeabilidade intestinal, favorecendo a invasão do patógeno. Essa disbiose pode levar ao aumento de bactérias mucolíticas, reduzindo a espessura da camada protetora de muco. Além disso, sugerimos que a presença de ST2 possa induzir a resposta inflamatória culminando no estabelecimento da infecção sistêmica observado pela presença de *B. abortus* no fígado, baço e LMN dos animais. Quanto aos animais deficientes para ST2 (à direita) acreditamos que sua microbiota "naturalmente" disbiótica seja capaz de competir com *Brucella* spp. e que uma menor quantidade da bactéria consiga atravessar a barreira epitelial que, por sua vez, não sofre alteração da permeabilidade. A ausência de ST2 reduz a resposta inflamatória celular, que culmina na redução da carga bacteriana observada no fígado e baço desses animais.

8. REFERÊNCIAS

- Ackermann, M. R.; cheville, N. F.; deyo, B. L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Pathol*, v. 25, n. 1, p. 28-35, Jan 1988.
- Adjoo, M. J. *et al.* A study on the use of male animal models for developing a live vaccine for brucellosis. *Transbound Emerg Dis*, v. 55, n. 3-4, p. 145-51, May 2008.
- Ali S, Huber M, Kollewe C, *et al.* IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 20;104(47):18660-5. Epub 2007 Nov 14.
- Annunziato F, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Mar;135(3):626-35. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.001. Epub 2014 Dec 18.
- Atarashi K., Nishimura J., Shima T., Umesaki Y., Yamamoto M., Onoue M., *et al.* ATP drives lamina propria Th17 cell differentiation. *Nature* 455, 2008. 808–812. 10.1038/nature07240
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915–1920.
- Bae S, Kang T, Hong J, *et al.* Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity. *J Biol Chem*. 2012 Mar 9;287(11):8205-13. doi: 10.1074/jbc.M111.295055. Epub 2012 Jan 23.
- Baekkevold ES, Roussigne M., Yamanaka T, *et al.* Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in endothelial venules of high human stature. *Im J Pathol*. 2003; 163: 69-79
- Bandara, A. B. *et al.* *Brucella suis* urease encoded by ure1 but not ure2 is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol*, v. 7, p. 57, Jun 19 2007.
- Barquero-Calvo, E. *et al.* *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*, v. 2, n. 7, p. e631, Jul 18 2007.
- Belkaid Y, Hand T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell*. 2014 Mar 27; 157(1): 121–141. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011
- Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*. 2017;46(4):562–576.
- Beltran CJ, Nunez LE, Diaz-Jimenez D, Farfan N, Candia E, Heine C, *et al.* Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* (2010) 16(7):1097–107.10.1002/ibd.21175
- Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(5):356–368.

- Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science*. 1994;266(5188):1253–1255.
- Boschiroli, M. L. et al. The *Brucella* suis virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 3, p. 1544-9, Feb 5 2002.
- Brenchley, J. M.; Douek, D. C. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol*, v. 30, p. 149-73, 2012.
- Buffie C. G., Pamer E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Rev. Immunol*. 2013. 13, 790–801. 10.1038/nri3535
- Bulek K, Swaidani S, Qin J, et al. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol*. 2009 Mar 1;182(5):2601-9. doi: 10.4049/jimmunol.0802729.
- Camilleri M, Madsen K, Spiller R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil*. 2012 Jun;24(6):503-12. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921
- Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Van Meerveld BG, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2012;24
- Cani P. D., Delzenne N. M. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol. Ther*. 2011. 130, 202–212. 10.1016/j.pharmthera.2011.01.012
- Carlstedt I, Herrmann A, Karlsson H, Sheehan J, Fransson LA, Hansson GC. Characterization of two different glycosylated domains from the insoluble mucin complex of rat small intestine. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(25):18771–18781.
- Carriere V, Roussel L., Ortega N, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for the ST2 receptor, is a nuclear factor associated with in vivo chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 282-287)
- Carvalho Neta, A. V. et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J*, v. 184, n. 2, p. 146-55, May 2010.
- Cayrol C, Girard JP. IL-1-like cytokine IL-1 is inactivated after caspase-1 maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 9021-9026
- Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): a nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev*. 2018 Jan;281(1):154-168. doi: 10.1111/imr.12619.
- Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, et al. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2551-5.
- Chanos, P.; Williams, D. R. Anti-Listeria bacteriocin-producing bacteria from raw ewe's milk in northern Greece. *J Appl Microbiol*, v. 110, n. 3, p. 757-68, Mar 2011.
- Chain, P.S., Comerici, D.J., Tolmasky, M.E., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Vergez, L.M., Aguero, F., Land, M.L., Ugalde, R.A., and Garcia, E. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. 2005. *Infect Immun* 73, 8353-8361.

Churin, Y. *et al.* Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol*, v. 161, n. 2, p. 249-55, Apr 28 2003.

Cereja WB, Yoon J, Bartemes KR, *et al.* A new cytokine of the IL-1 family, IL-33, actively activates human eosinophils. *Allergy Clin Immunol*. 2008 Jun; 121 (6): 1484-90

Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nature Medicine*. 2010;16(2):228–23

Cohen ES, Scott IC, Majithiya JB, *et al.* Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun*. 2015 Sep 14;6:8327. doi: 10.1038/ncomms9327.

Collins, C.M., and D'Orazio, S.E. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. 1993. *Mol Microbiol* 9, 907-913.

Cretney E, Kallies A, Nutt SL. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol*. 2013 Feb; 34(2):74-80.

Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(6):435–446.

Corbel, M. J.; Morgan, W. J. B. Genus *Brucella* Meyer and Shaw. In: HOLT, J. G. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology* Baltimore: Williams and Wilkins, v.1, 1984. p.377-388

Corbel, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, v. 3, n. 2, p. 213-21, Apr-Jun 1997.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009 May; 30(5):626-35.

De Jong, M. F.; Sun, Y. H.; Den Hartigh, A. B. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophage by the *Brucella* type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, v. 70, p. 1378-1396, 2008.

Delpino, M. V. *et al.* A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. *Infect Immun*, v. 75, n. 1, p. 299-305, Jan 2007.

Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001;73(6):1131S–1141S.

Diehl G. E., Longman R. S., Zhang J., Breart B., Galan C., Cuesta A., *et al.* Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX3CR1hi cells. *Nature* 2013. 494 116–120. 10.1038/nature11809

Diehl Giuffrida P, Caprioli F, Faccioli F, Di Sabatino A. The role of interleukin-13 in chronic inflammatory intestinal disorders. *Autoimmunity reviews*. 2019.

Dinarello CA. Immune and inflammatory functions of the interleukin family. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 519-550.

Dinareello, Charles A. immunity. *Immunol Rev.* 2018 Jan; 281(1): 8–27.doi: 10.1111/imr.12621.

Duval A, Mirey E, *et al.* The central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 15502-15507

Elinav, E. *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, v. 145, n. 5, p. 745-57, May 27 2011.

Elinav, E.; Thaiss, C. A.; Flavell, R. A. Analysis of microbiota alterations in inflammasome-deficient mice. *Methods Mol Biol*, v. 1040, p. 185-94, 2013.

Esterhazy, D., Loschko, J., London, M., Jove, V., Oliveira, T. Y., & Mucida, D. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of eripheral T(reg) cells and tolerance. *Nat Immunol*, 2016. 17(5), 545-555. doi: 0.1038/ni.3408

Esterhazy, D., Canesso, M. C. C., Muller, P. A., Lockhart, A., Mesin, L., Faria, A. M., & Mucida, D. Compartmentalized lymph node drainage dictates intestinal adaptive immune responses. 2018. *BioRxiv* 299628 (*Preprint*)(Available from: doi: <https://doi.org/10.1101/299628>).

Franchi L, Kamada N, Nakamura Y, Burberry A, Kuffa P, Suzuki S. NLRC4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nature Immunology.* 2012;13:449–456.

Frank D. N., Pace N. R. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008. 24, 4–10. 10.1097/MOG.0b013e3282f2b0e8

Fu J, Wei B, Wen T, *et al.* Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2011;121(4):1657–1666.

G Bergers, A Reikerstorfer, S Braselmann, *et al.* Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* 1994 Mar 1; 13(5): 1176–1188

G. E., Longman, R. S., Zhang, J. X., Breart, B., Galan, C., Cuesta, A., Littman, D. R.. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature*, 494(7435), 2013.116-120. doi:10.1038/nature11809

García-Miguel M, González MJ, Quera R, Hermoso MA. Innate immunity modulation by the IL-33/ST2 system in intestinal mucosa. *Biomed Res Int.* 2013;2013:142492.

Garrett, W. S.; Gordon, J. I.; Glimcher, L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 859-70, Mar 19 2010

Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annual Review of Physiology.* 1995;57:607–634

Grilló, M. J. *et al.* What have we learned from brucellosis in the mouse model? . *Vet. Microbiol.*, v. 43, n. 1, p. 1-35, 2012.

Guarner, F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, Madrid, v. 22, n. 2, p. 14-19, maio 2007.

Guarner, F.; Malagelada Junior, R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, London, v. 8, n. 361, p. 512- 519, feb. 2003. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0.

Gum JR, Jr., Crawley SC, Hicks JW, Szymkowski DE, Kim YS. MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;291(3):466–475

Gutierrez-Jimenez, C., Mora-Cartin, R., Altamirano-Silva, P., Chacon-Diaz, C., Chaves-Olarte, E., Moreno, E., and Barquero-Calvo, E. Neutrophils as Trojan Horse Vehicles for *Brucella abortus* Macrophage Infection. 2019. *Front Immunol* 10, 1012.

Gomes, M. T. *et al.* The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. *Front Cell Infect Microbiol*, v. 2, p. 130, 2012.

Gomes, M. T. *et al.* Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. *J Immunol*, v. 190, n. 7, p. 3629-38, Apr 1 2013.

Gomes, M. T. *et al.* TLR9 is required for MAPK/NF-kappaB activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. *J Leukoc Biol*, v. 99, n. 5, p. 771-80, May 2016.

Gow NA , van de Veerdonk FL , Brown AJ *et al.* *Nat Rev Microbiol*. 2011 Dec 12;10(2):112-22. doi: 10.1038/nrmicro2711.

Gorvel, J. P.; Moreno, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, v. 90, n. 1-4, p. 281-97, Dec 20 2002.

Guzman-Verri, C. *et al.* The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 19, p. 12375-80, Sep 17 2002.

Haag L.-M., Fischer A., Otto B., Plickert R., Kühl A. A., Göbel U. B., *et al.* . Intestinal microbiota shifts towards elevated commensal *Escherichia coli* loads abrogate colonization resistance against *Campylobacter jejuni* in mice. *PLoS ONE* 7: 2012. e35988. 10.1371/journal.pone.0035988

Havran WL, Chien YH, Allison JP. Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant $\gamma\delta$ antigen receptors. *Science*. 1991;252(5011):1430–1432.

Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102(7):2660–2669.

Höcker M, Wiedenmann B. Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;859:160–174.

Hodzic Z, Schill EM, Bolock AM, *et al.* IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. *Cytokine*. 2017 Dec;100:1-10. doi: 10.1016/j.cyt.2017.06.017. Epub 2017 Jul 4.

- Hong, P. C.; Tsois, R. M.; Ficht, T. A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun*, v. 68, n. 7, p. 4102-7, Jul 2000
- Hogan, S. P.; Waddell, A.; Fulkerson, P. C. Eosinophils in infection and intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol*, v. 29, n. 1, p. 7-14, Jan 2013.
- Hunt, A. C.; Bothwell, P. W. Histological findings in human brucellosis. *J Clin Pathol*, v. 20, n. 3, p. 267-72, May 1967.
- I., Pamer E. G. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 2011. 353–360. 10.1016/j.coi.2011.03.001
- Ivanov I. I., Atarashi K., Manel N., Brodie E. L., Shima T., Karaoz U., *et al.* . Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 2009. 485–498. 10.1016/j.cell.2009.09.033
- Iwahana, H., Yanagisawa, K., Ito-Kosaka, A., *et al.* Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *European Journal of Biochemistry*. Volume 264, Issue 2. 25 December 2001 <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00615.x>
- Izcue, A., Coombes, J. L., & Powrie, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27, 313-338. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132657.
- IZADJOO, M. J. *et al.* A study on the use of male animal models for developing a live vaccine for brucellosis. *Transbound Emerg Dis*, v. 55, n. 3-4, p. 145-51, May 2008. Jarchum
- Johnston L.K., Hsu C.L., Krier-Burris R.A., Chhiba K.D., Chien K.B., McKenzie A., Berdnikovs S., Bryce P.J. IL-33 Precedes IL-5 in Regulating Eosinophil Commitment and Is Required for Eosinophil Homeostasis. *J. Immunol.* 2016;197:3445–3453. doi: 10.4049/jimmunol.1600611.
- Karlsson F., Tremaroli V., Nielsen J., Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes* 62, 2013. 3341–3349. 10.2337/db13-0844
- Klose CS, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol.* 2016 Jun 21;17(7):765-74. doi: 10.1038/ni.3489.
- Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*. 2010;12(5):319–330.
- Ko, J.; Splitter, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev*, v. 16, n. 1, p. 65-78, Jan 2003.
- Kole, A.; Maloy, K. J. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 380, p. 19-38, 2014.
- Kunze MM, Benz F, Brauß TF, *et al.* sST2 translation is regulated by FGF2 via an hnRNP A1-mediated IRES-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jul;1859(7):848-59. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.05.005. Epub 2016 May 8.

- Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, *et al.* IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol.* 2009 Nov 15;183(10):6469-77. doi: 10.4049/jimmunol.0901575. Epub 2009 Oct 19.
- Lapaque, N. *et al.* *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, v. 8, n. 1, p. 60-6, Feb 2005.
- Lefrancais E, Roga S, Gautier V, *et al.*, IL-33 is processed in mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 1673-1678
- Lefrancais E, Cayrol C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw.* 2012;23(4):120–7.
- Lefrancais E, Duval A, Mirey E, *et al.* The central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 15502-15507.
- Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, *et al.* Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017 Apr;17(4):219-232. doi: 10.1038/nri.2017.7. Epub 2017 Mar 6.
- Liew FY, Girard JP, Turnquist HR, Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol* . 2016 ; 16 : 676-689
- Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M, *et al.* Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure.* 2009 Oct 14;17(10):1398-410. doi: 10.1016/j.str.2009.08.009.
- Liu X, Hammel M, He Y, *et al.* Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Sep 10;110(37):14918-23. doi: 10.1073/pnas.1308651110. Epub 2013 Aug 26
- Liu B, Tai Y, Achanta S *et al.* IL - 33 / ST2 signaling excites the sensory neurons and mediates the itching response in a model of allergy of contact with poison ivy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113: E7572-E7579
- Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, *et al.* T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):6930-5.
- Lopetuso LR, Scaldaferri F, Pizarro TT. Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012 Oct 14;5(1):18. doi: 10.1186/1755-1536-5-18.
- Lumsden, A. B.; Henderson, J. M.; Kutner, M. H. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology*, v. 8, n. 2, p. 232-6, Mar-Apr 1988
- Lupp C., Robertson M. L., Wickham M. E., Sekirov I., Champion O. L., Gaynor E. C., *et al.* Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2, 2007. 119–129. 10.1016/j.chom.2007.06.010
- Macedo, G. C. *et al.* Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J Immunol*, v. 180, n. 2, p. 1080-7, Jan 15 2008.

Mahapatro M, Foersch S, Hefele M, et al. Programming of Intestinal Epithelial Differentiation by IL-33 Derived from Pericryptal Fibroblasts in Response to Systemic Infection. *Cell Rep*. 2016 May 24;15(8):1743-56. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.049. Epub 2016 May 12.

Malinarich FH, Grabski E, Worbs T, et al. Constant TCR triggering suggests that the TCR expressed on intestinal intraepithelial $\gamma\delta$ T cells is functional in vivo. *European Journal of Immunology*. 2010;40(12):3378–3388.

Malik A, Sharma D, Zhu Q, et al. IL-33 regulates the IgA-microbiota axis to restrain IL-1 α -dependent colitis and tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2016 Dec 1;126(12):4469-4481. doi: 10.1172/JCI88625. Epub 2016 Oct 24.

Maloy, K. J.; Powrie, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, v. 474, n. 7351, p. 298-306, Jun 15 2011.

Martin MU. Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Semin Immunol*. 2013 Dec 15;25(6):449-57. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.006. Epub 2013 Nov 11.

Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nature immunology*. 2016;17(2):122–31.

Mazmanian S. K., Liu C. H., Tzianabos A. O., Kasper D. L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 2005. 107–118. 10.1016/j.cell.2005.05.007

Maynard C. L., Elson C. O., Hatton R. D., Weaver C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489, 2012. 231–241. 10.1038/nature11551

McAuley JL, Linden SK, Chin WP, et al. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(8):2313–2324.

Mccabe, L. R.; PARAMESWARAN, N. Understanding the Gut-Bone Signaling Axis: Mechanisms and Therapeutic Implications. Springer International Publishing, 2017.

McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(4):265–278

Mildner M, Storka A, Lichtenauer M, et al. Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans. *Cardiovasc Res*. 2010 Sep 1;87(4):769-77. doi: 10.1093/cvr/cvq104. Epub 2010 Apr 2.

Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, et al. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Aug 25;112(34):10762-7. doi: 10.1073/pnas.1509070112. Epub 2015 Aug 4.

Moritz DR, RH Rodewald, Gheyselinck J, et al. IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed in immature and mature mast cells and in mast cell progenitors in fetal blood. *J Immunol*. November 1, 1998; 161 (9): 4866-74

Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. 2008 Oct 6;3(10):e3331. doi: 10.1371/journal.pone.0003331.

Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity*. 2015 Jun 16; 42(6):1005-19.

Moog, F. The lining of the small intestine. 1981.Sci Am, Nov;245(5):154-8, 160, 162 et passiom.

Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005;62(12):1297–1307.

Nakato, G. *et al.* Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J Immunol*, v. 189, n. 4, p. 1540-4, Aug 15 2012.

Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et.al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 2010 Apr 29;464(7293):1367-70. doi: 10.1038/nature08900. Epub 2010 Mar 3.

Neutra, M.R., Mantis, N.J., and Kraehenbuhl, J.P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2, 1004-1009.

Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18581-6. doi: 10.1073/pnas.1003059107. Epub 2010 Oct 11.

Oh JE, Kim BC, Chang DH, Kwon M, Lee SY, Kang D, Kim JY, Hwang I, Yu JW, Nakae S, Lee HK. Dysbiosis-induced IL-33 contributes to impaired antiviral immunity in the genital mucosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(6):E762–71.

Oh JE, Kim BC, Chang DH, et al. Dysbiosis-induced IL-33 contributes to impaired antiviral immunity in the genital mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 9;113(6):E762-71. doi: 10.1073/pnas.1518589113. Epub 2016 Jan 25.

Oliveira, F. S. *et al.* Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and -2 play no role in controlling *Brucella abortus* infection in mice. *Clin Dev Immunol*, v. 2012, p. 861426, 2012.

Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2014 Aug 28;158(5):1000-1010. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.006.

Paixao, T. A. *et al.* Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun*, v. 77, n. 10, p. 4197-208, Oct 2009.

Paraná, S. D. E. D. S. D. Protocolo de manejo clínico e vigilância em saúde para brucelose humana no Estado do Paraná. SAÚDE, S. D. V. E. Curitiba: 70 p. 2015.

Pasquali, P. *et al.* *Brucella abortus* RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain B. abortus 2308. *Infect Immun*, v. 71, n. 5, p. 2326-30, May 2003

Pichery M, E Mirey, Mercier P, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in epithelial barrier tissues of mice, lymphoid organs, brain, embryos and inflamed tissues. In situ analysis using a novel reporter strain for the uptake of the IL-33-LacZ gene. *J Immunol*. 2012; 188: 3488-3495.

Pinto, A. L. *et al.* Characterization of anti-Listeria bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int J Food Microbiol*, v. 129, n. 1, p. 50-8, Jan 31 2009.

Porte, F.; Liautarde; Kohler, S. Early Acidification of Phagosomes Containing *Brucella suis* Is Essential for Intracellular Survival in Murine Macrophages. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 8, p. 4041-4047, 1999

Rathinam, V. A. K.; CHAN, F. K. Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. *Trends Mol Med*, v. 24, n. 3, p. 304-318, Mar 2018

Rea, M. C. *et al.* Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 20, p. 9352-7, May 18 2010

Renz, H.; Brandtzaeg, P.; Hornef, M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*, v. 12, n. 1, p. 9-23, Dec 9 2011.

Rossetti, C. A. *et al.* Systems biology analysis of *Brucella* infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome. *PLoS One*, v. 8, n. 12, p. e81719, 2013.

Roussel L, Erard M., Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for chromatin binding through the acidic pocket H2A-H2B *EMBO Rep*. 2008; 9: 1006-1012

Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*. 2006;108(5):1435–1440.

Salcedo, S.P., Marchesini, M.I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., *et al.* *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. 2008. *PLoS Pathog* 4, e21.

Sangari, F. J.; Aguero, J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiologia*, v. 12, n. 2, p. 207-18, Jun 1996.

Sangari, F. J. *et al.* Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun*, v. 75, n. 2, p. 774-80, Feb 2007.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, *et al.* IL-33, a cytokine similar to interleukin-1, which signals through the IL-1 receptor-related ST2 protein and induces cytokines associated with helper type 2. *Immunity*. 2005; 23: 479-490

Schroeder, J. A. *et al.* Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem*, v. 276, n. 16, p. 13057-64, Apr 20 2001

Seleem, M. N.; Boyle, S. M.; Sriranganathan, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol*, v. 140, n. 3-4, p. 392-8, Jan 27 2010.

Shao, J.; Sheng, H. Amphiregulin promotes intestinal epithelial regeneration: roles of intestinal subepithelial myofibroblasts. *Endocrinology*, v. 151, n. 8, p. 3728-37, Aug 2010.

Shimokawa C, Kanaya T, Hachisuka M, *et al.* Mast Cells Are Crucial for Induction of Group 2 Innate Lymphoid Cells and Clearance of Helminth Infections. *Immunity*. 2017 May 16;46(5):863-874.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.017.

Shoyab, M. *et al.* Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, n. 17, p. 6528-32, Sep 1988.

Singh, R. *et al.* Status of bacterial colonization, Toll-like receptor expression and nuclear factor-kappa B activation in normal and diseased human livers. *Clin Immunol*, v. 138, n. 1, p. 41-9, Jan 2011

Sipos F, Muzes G, Valcz G, *et al.* Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2010 Apr;45(4):440-8. doi: 10.3109/00365521003624144.

Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, *et al.* IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol*. 2008 Aug;20(8):1019-30. doi: 10.1093/intimm/dxn060. Epub 2008 Jun 11.

Srikanth C. V., McCormick B. A. Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2008;626827. 10.1155/2008/626827

Starr, T. *et al.* *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, v. 9, n. 5, p. 678-94, May 2008.

Staurengo-Ferrari L, Trevelin SC, Fattori V, Nascimento DC, de Lima KA, Pelayo JS, Figueiredo F, Casagrande R, Fukada SY, Teixeira MM, Cunha TM, Liew FY, Oliveira RD, Louzada-Junior P, Cunha FQ, Alves-Filho JC, Verri WA. Interleukin-33 Receptor (ST2) Deficiency Improves the Outcome of *Staphylococcus aureus*-Induced Septic Arthritis. *Front Immunol*. 2018;9:962.

Stecher B., Robbiani R., Walker A. W., Westendorf A. M., Barthel M., Kremer M., *et al.* *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007. 5, 2177–2189. 10.1371/journal.pbio.0050244

Stephens WZ, Round JL. IgA targets the troublemakers. *Cell Host Microbe*. 2014 Sep 10;16(3):265-7. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.012.

Silva, F. L.; Paixao, T. A.; Borges, A. M. Brucelose Bovina. In: (Ed.). *Cad Tec Vet Zoot*, v.47, 2005. p.1-12.

Suzukawa M, Ikura M, Koketsu R, *et al.* An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):5981-9.

Talham G. L., Jiang H. Q., Bos N. A., Cebra J. J. Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect. Immun.* 1999. 67, 1992–2000.

Tam, R.; SAIER JR, M. H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 57, p. 320-346, 1993.

Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016;535(7610):65–74.

Towne JE, Renshaw BR, Douangpanya J *et al.* IL-36 α , IL-36 β , and IL-36 γ or antagonist (IL-36Ra) activity. *J Biol Chem*. 2011 Dec 9; 286(49): 42594–42602. Published online 2011 Sep 30. doi: 10.1074/jbc.M111.267922

- Tremaroli V., Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. 2012. *Nature* 489, 242–249. 10.1038/nature11552
- Tsuda H, Komine M., Tominaga SI, Ohtsuki M. Identification of the human IL-33 promoter region responsive to IFN γ induction. *J Dermatol Sci*. 2017; 85: 137-140.
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Nov;9(11):799-809. doi: 10.1038/nri2653.
- Van den Elsen LW, Poyntz HC, Weyrich LS, Young W, Forbes-Blom EE. Embracing the gut microbiota: the new frontier for inflammatory and infectious diseases. *Clin Transl Immunology*. 2017;6(1):e125.
- Vander Lugt MT, Braun TM, Hanash S, Ritz J, Ho VT, Antin JH, *et al*. ST2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death. *N Engl J Med* (2013) 369(6):529–39. 10.1056/NEJMoa1213299
- Van Passel MWJ, Kant R, Zoetendal EG, *et al*. The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e16876
- Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, *et al*. ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2015 Oct 7;7(308):308ra160. doi: 10.1126/scitranslmed.aab0166.
- Zhao J, Wei J, Mialki RK, *et al*. F-box protein FBXL19-mediated ubiquitination and degradation of the receptor for IL-33 limits pulmonary inflammation. *Nat Immunol*. 2012 Jun 3;13(7):651-8. doi: 10.1038/ni.2341
- Zhao J, Chen Q, Li H, *et al*. Lysophosphatidic acid increases soluble ST2 expression in mouse lung and human bronchial epithelial cells. *Cell Signal*. 2012 Jan;24(1):77-85. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.08.004. Epub 2011 Aug 17.
- Weinberg EO, Shimp M, De Keulenaer GW, *et al*. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002 Dec 3;106(23):2961-6.
- West N. Coordination of immune-stroma crosstalk by IL-6 family cytokines. *Frontiers in Immunology*. 2019.
- WHO. Brucellosis in humans and animals: World Health Organization: 1-102 p. 2006
- Solera, J. Update on brucellosis: therapeutic challenges. *Int J Antimicrob Agents*, v. 36 Suppl 1, p. S18-20, Nov 2010
- Wichmann A., Allahyar A., Greiner T. U., Plovier H., Lundén G. Ö., Larsson T., *et al*. Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell Host Microbe* 14, 2013. 582–590. 10.1016/j.chom.2013.09.012
- Wynn TA. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol*. 2015 May;15(5):271-82. doi: 10.1038/nri3831. Epub 2015 Apr 17.

Yan F, Cao H, Cover TL, *et al.* Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6):2242-53. doi: 10.1172/JCI44031. Epub 2011 May 23.

Yan, Y. *et al.* Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One*, v. 4, n. 6, p. e6073, Jun 29 2009.

Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, *et al.* Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett.* 1993 Feb 22;318(1):83-7.

Young, E. J. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. *APMIS Suppl*, v. 3, p. 17-20, 1988.

9. ANEXOS

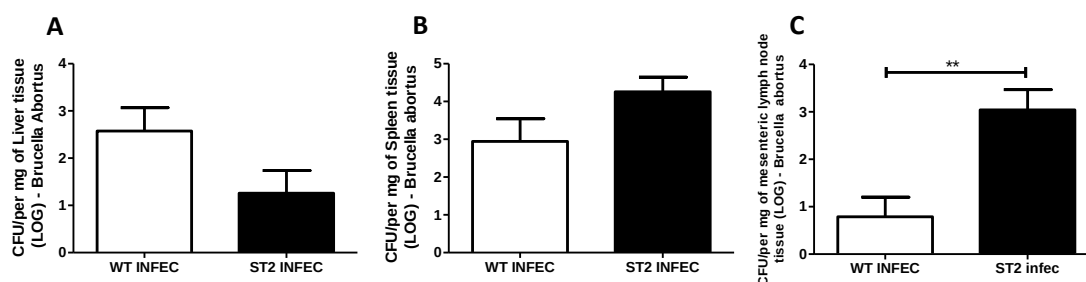


FIGURA 15: Contagem de CFU no fígado, Baço e linfonodos mesentéricos em camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais não infectados e após 14 dias de infecção por via oral por *Brucella abortus*. Animais WT e deficientes para ST2 foram infectados, por via oral, por 1×10^9 UFC de *B. abortus* e sacrificados após 14 dias de infecção. O fígado (A), Baço (B) e lindonodo mesentérico (C) dos animais foi coletado e processado para avaliação do título de Bactérias viáveis através da contagem de CFU. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 3 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

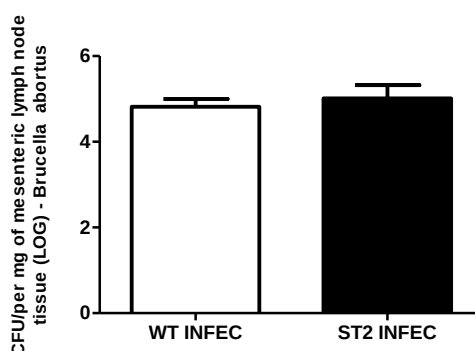


FIGURA 16: Contagem de CFU nos linfonodos mesentérico em camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais infectados após 14 dias de infecção por via sistêmica por *Brucella abortus*. Animais WT e deficientes para ST2 foram infectados, por via intraperitoneal, por 1×10^7 UFC de *B. abortus* e sacrificados após 14 dias de infecção. Os lindonodos mesentérico dos animais foram coletados e processados para avaliação do título de Bactérias viáveis através da contagem de CFU. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 3 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

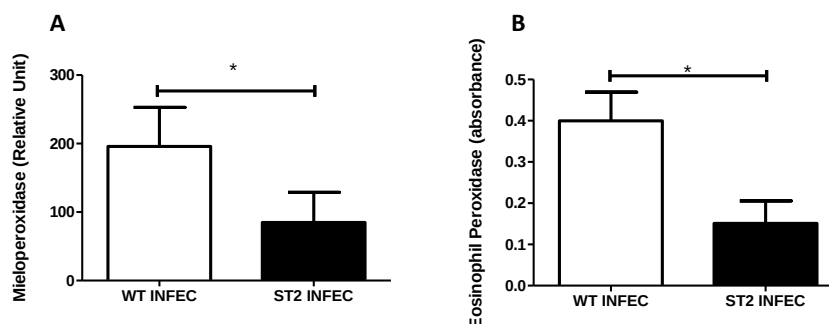


FIGURA 17: Perfil celular intestinal em camundongos WT versus ST2^{-/-}, em animais após 14 dias de infecção por via oral por *Brucella abortus*. Animais WT e ST2^{-/-} infectados, por via oral, por 1×10^9 UFC de *B. abortus* e após 14 dias de infecção foi coletado amostras do intestino delgado para processamento e avaliação de Neutrófilos (A) e Eosinófilos (B) . Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n = 5 - 7). Os dados são representativos de 3 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001