

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

CAMILA BERNARDO DE BRITO

**O PAPEL DOS RECEPTORES $Fc\gamma RIIB$ E $Fc\gamma RIIB$ NA LESÃO INDUZIDA POR
ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL**

**BELO HORIZONTE
NOVEMBRO/2017**

Camila Bernardo de Brito

**O PAPEL DOS RECEPTORES Fc γ RIIB E Fc γ RIII NA LESÃO INDUZIDA POR
ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL**

Dissertação de mestrado
apresentado à Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais sob a orientação da Profa.
Dra. Danielle da Glória de Souza
e Co-orientação do Prof. Dr. Caio
Tavares Fagundes.

**BELO HORIZONTE
NOVEMBRO/2017**

043

Brito, Camila Bernardo de.

O papel dos receptores Fc γ RIIB e Fc γ RIII na lesão induzida por isquemia e reperfusão intestinal [manuscrito] / Camila Bernardo de Brito. - 2017.

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniele da Gloria de Souza. Co-orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Isquemia. 3. Reperfusão. 4. Microbioma Gastrointestinal. 5. Inflamação. I. Souza, Daniele da Gloria de. II Fagundes, Caio Tavares. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CAMILA BERNARDO DE BRITO
Nº REGISTRO: 2016656039

Coorientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes
Relator e Suplente: Prof. Fabiana Machadp

Às 14:00 horas do dia 10 de novembro de 2017, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelo Prof. Elisabeth Neumann (Departamento de microbiologia- UFMG), pela Dra. Barbara Maximino Rezende (Departamento de Imunologia e bioquímica- UFMG) e a Profa. Daniele da Glória de Souza - Orientadora, para julgar o trabalho final "O Papel dos Receptores FcyRRIIB e FcyRIII Na Lesão Induzida Por Isquemia e Reperfusão Intestinal", da aluna **Camila Bernardo de Brito**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 10 de novembro de 2017.

Prof. Elisabeth Neumann

Elisabeth Neumann

Dra. Barbara Maximino Rezende

Barbara Maximino Rezende

Profa. Daniele da Glória de Souza (Orientadora)

Danielle da Glória de Souza

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

Flávio Guimarães da Fonseca

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer minha família por todo apoio ao longo dessa trajetória. Mãe, meu exemplo de garra e determinação. Aos meus irmãos, Mariana e Rafael por sempre acreditarem em mim. Ao meu sobrinho Vitor, por todo amor e alegria e aos meus cunhados por todo suporte.

Agradeço, à Prof. Danielle (Dani) e ao Prof. Caio, meus orientadores, por toda confiança e apoio. Vocês são exemplos a serem seguidos. Obrigada pelos sorrisos, pelas críticas, pelo apoio e por acreditar em mim.

Agradeço às minhas amigas de bancada e da vida Raquel, Renata e Zélia. Por todos os momentos maravilhosos que passamos durante esses anos. Obrigada por todos os ensinamentos e por despertarem em mim a vontade de seguir a vida acadêmica.

Aos amigos de laboratório do LIMHO por todos os momentos que compartilhamos, vocês são parte essencial deste trabalho. Em especial, a Brenda e a Micheli por todo companheirismo, carinho, ajuda em experimentos e apoio nos momentos difíceis. Vocês são de mais!!! Thaiane e Jordana pelo companheirismo durante as disciplinas e por todos esses dois anos de mestrado. Á Tainá e ao João, pela ajuda nos experimentos, eu não poderia ter melhores alunos de IC. Ao Vidy, Ian, Rafa, Gabi, Vinicius, Felipe, Carla e Jordane pelos momentos incríveis que compartilhamos dentro e fora do laboratório, vocês tornaram tudo mais leve. Á prof. Mila por todo apoio durante esses anos. Á Prof. Vivian por todo carinho, conselhos científicos e conversas. A Gil e a Frank por todo suporte no laboratório e pela amizade.

Ao grupo Imunofar por toda colaboração e discussão acadêmica. Em especial a Ilma por todo apoio técnico.

Ás minhas amigas Talita e Leticia, por sempre acreditarem em mim. Eu não chegaria aqui sem vocês. Obrigada por tudo!!

RESUMO

A isquemia e reperfusão intestinal (IRI) é acompanhada por uma resposta inflamatória exacerbada caracterizada pelo influxo de neutrófilos e liberação de diversos mediadores inflamatórios para o tecido intestinal resultando em lesão tecidual e morte. A microbiota indígena é parte essencial para o controle dessa resposta inflamatória, uma vez que animais Germ-Free (GF) apresentam atenuação da lesão local ou sistêmica após IRI. Parte da hiporresponsividade inflamatória de animais GF frente a IRI está associada a menor concentração de anticorpos naturais auto reativos induzidos pela microbiota, que também são parte essencial para o desencadeamento da lesão de reperfusão, uma vez que estes anticorpos são capazes de reconhecer neoantígenos que são expostos pela isquemia e depositar no tecido intestinal. No entanto, ainda não se sabe se estes anticorpos depositados são capazes de ativar os receptores do tipo $Fc\gamma R$, fazendo com que estes receptores exerçam papel importante na lesão de reperfusão. Diante disso, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o papel dos receptores $Fc\gamma RIII$ e $Fc\gamma RIIB$ na lesão induzida por IRI. A partir dos nossos resultados observamos que a lesão de IRI levou à deposição de IgG no tecido intestinal, sugerindo que os receptores $Fc\gamma$ podiam desempenhar papel importantes nesta patologia inflamatória. Assim, observamos que camundongos $Fc\gamma RIII^{-/-}$ foram protegidos da lesão por reperfusão intestinal, apresentando maiores taxas de sobrevivência e menor lesão tecidual, além de menor influxo de neutrófilos e liberação de mediadores pró-inflamatórios para o tecido intestinal. Por outro lado, observamos que camundongos $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ apresentaram antecipação e maior taxa de letalidade do que camundongos WT após IRI. Esta maior letalidade foi associada a uma maior lesão tecidual e translocação bacteriana para outros órgãos. A maior susceptibilidade à lesão de reperfusão em animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ foi associada a maior deposição de IgG no tecido intestinal e alterações na quantidade e no repertório de IgG circulante nesses animais, sugerindo que $Fc\gamma RIIB$ controla a geração de IgG auto-reativos importantes para a lesão de reperfusão. Interessantemente, também observamos que a microbiota intestinal está envolvida no controle da produção dos anticorpos auto reativos em

animais $Fc\gamma RIIb$. Dessa forma, podemos concluir que os receptores $Fc\gamma$ desempenham importante papel na lesão induzida por IRI.

ABSTRACT

Intestinal ischemia and reperfusion (IRI) is accompanied by an exacerbated inflammatory response characterized by the influx of neutrophils and release of inflammatory mediators into the intestinal tissue resulting in tissue injury and death. The indigenous microbiota is an essential part for the control of this inflammatory response, since Germ-free mice (GF) present attenuation of local or systemic lesion after IRI. Part of inflammatory hyporesponsiveness of GF versus IRI animals is associated with a lower concentration of auto-reactive natural antibodies induced by microbiota, which are also essential for triggering reperfusion injury, since these antibodies are able to recognize neoantigens that are exposed by ischemia and deposited into intestinal tissue. However, it is not yet known whether these deposited antibodies are capable of activating Fc γ R receptors. Therefore, the objective of our study was to evaluate the role of Fc γ RIII and Fc γ RIIB receptors in intestinal reperfusion injury. Our results showed that the IRI injury led to deposition of IgG in intestinal tissue, suggesting that the Fc receptors could play an important role in this inflammatory pathology. Thus, we observed that Fc γ RIII^{-/-} mice were protected from intestinal reperfusion injury, presenting higher survival rates and less tissue injury, as well as lower influx of neutrophils and release of proinflammatory mediators into the intestinal tissue. On the other hand, we observed that Fc γ RIIB^{-/-} presented earlier and higher lethality rates than WT mice during intestinal reperfusion injury. This higher lethality was associated with a greater tissue injury and bacterial translocation to other organs. The increased susceptibility to reperfusion injury in Fc γ RIIB^{-/-} mice was associated with increased IgG deposition in intestinal tissue and changes in the amount and repertoire of circulating IgG in these animals, suggesting that Fc γ RIIB controls the generation of injury-promoting IgG. Interestingly, we have also observed that the intestinal microbiota is involved in controlling the production of autoantibodies in Fc γ RIIB animals. Thus, we can conclude that Fc γ receptors play an important role in IRI-induced injury.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	8
1 JUSTIFICATIVA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 A reposta inflamatória	15
2.2 A microbiota intestinal.....	17
2.2.1 A microbiota intestinal e as imunoglobulinas.....	20
2.2 A lesão induzida por isquemia e reperfusão intestinal.....	22
2.3 A imunoglobulina G (IgG) e os seus receptores FcγR.....	26
2.3.1 O receptor de ativação FcγRIII.....	28
2.3.2 O Receptor de inibição FcγRIIB	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Indução da Isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior em camundongos (IRI)	35
4.2 Microhematócrito para indicação de extravasamento plasmático.....	36
4.3 Coloração de H&E para avaliação histopatológica	36
4.4 Avaliação da permeabilidade vascular.....	37
4.5 Avaliação do acúmulo de neutrófilos pela quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO)	37
4.6 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	38
4.7 Imuno-histoquímica para análise da deposição de IgG	39
4.8 Quantificação de anticorpos circulantes.	40
4.9 Isolamento de enterócitos.....	40
4.10 Quantificação de anticorpos anti-antígenos intestinais.....	41
4.11 Quantificação de anticorpos anti-microbiota fecal	41
4.12 Depleção da microbiota com coquetel de antibióticos	42
4.13 Quantificação de hemoglobina	42
4.14 Avaliação da translocação bacteriana	43
4.15 Análise estatística	43

5 RESULTADOS	44
5.1 A lesão de reperfusão induz deposição de IgG no tecido intestinal.....	44
5.2 O receptor FcγRIII exerce importante papel pró-inflamatório no modelo de isquemia e reperfusão intestinal.	45
5.2.1 Animais FcγRIII ^{-/-} apresentam maior sobrevivência associada a menor lesão intestinal após IRI.	45
5.2.2 A ausência do receptor FcγRIII diminui o aumento de permeabilidade vascular no intestino após IRI	47
5.2.3 A ausência do receptor FcγRIII diminui o influxo de neutrófilos e a liberação de mediadores inflamatórios após IRI.	48
5.3 O receptor FcγRIIB é importante para o controle da lesão tecidual induzida pela isquemia e reperfusão intestinal	50
5.3.1 Camundongos deficientes para o receptor FcγRIIB ^{-/-} apresentam maior letalidade e lesão tecidual após IRI.....	50
5.3.3 Camundongos deficientes para o receptor FcγRIIb ^{-/-} não apresentam maior recrutamento neutrófilo e aumento na produção de mediadores inflamatórios após IRI quando comparado a animais WT.	52
5.3.4 Animais FcγRIIb ^{-/-} apresentam resposta de reperfusão precoce independente do recrutamento de neutrófilos	53
5.3.5 Animais FcγRIIB ^{-/-} apresentam maior deposição de IgG no tecido intestinal após 1h de reperfusão.	54
5.3.6 O receptor FcγRIIB regula o repertório de IgG exercendo assim importante papel na lesão induzida por IRI.	56
5.3.7 A microbiota intestinal está envolvida na produção acentuada de auto-anticorpos em animais FcγRIIB	58
6 DISCUSSÃO	60
Referências	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Componentes da resposta inflamatória
- Figura 2- Maturação do sistema imune local e sistêmico pela microbiota intestinal
- Figura 3- Mecanismo da lesão induzida por isquemia e reperfusão intestinal
- Figura 4 - Estrutura molecular da imunoglobulina G :
- Figura 5 - Vias de sinalização dos FcγRs de ativação e inibição:
- Figura 6- Regulação da produção de anticorpos pelo receptor FcγRIIb:
- Figura 7 - Planejamento experimental de Indução da Isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior em camundongos.
- Figura 8- Camundongos WT apresentam maior deposição de IgG no tecido intestinal após 30 minutos de isquemia e 3h de reperfusão:
- Figura 9- Camundongos FcγRIII^{-/-} apresentaram redução na taxa de mortalidade induzida por IRI:
- Figura 10- Camundongos FcγRIII^{-/-} apresentam menor lesão tecidual após isquemia e reperfusão intestinal
- Figura 11- A ausência do receptor FcγRIII resulta em menor extravasamento plasmático após IRI
- Figura 12- Animais FcγRIII^{-/-} apresentaram menor produção de mediadores inflamatórios no tecido intestinal
- Figura 13- Animais FcγRIIB^{-/-} apresentam maior mortalidade do que animais WT
- Figura 14- Camundongos FcγRIIb^{-/-} apresentam exarcebação da lesão tecidual induzida pela IRI
- Figura 15- A ausência do receptor FcγRIIb resultou em translocação bacteriana para outros órgãos após IRI
- Figura 16- A deleção do receptor FcγRIIb não altera a resposta inflamatória frente a IRI
- Figura 17- camundongos FcγRIIb^{-/-} apresentaram maior lesão tecidual independente do recrutamento de neutrófilos após 1h de reperfusão
- Figura 18- camundongos FcγRIIb^{-/-} apresentam maior deposição de IgG no tecido intestinal após 1h de reperfusão
- Figura 19- Camundongos FcγRIIB^{-/-} apresentam alteração no repertório de anticorpos

Figura 20- Animais $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ com 7 semanas de idade apresentam atraso na mortalidade após IRI

Figura 21- A depleção da microbiota intestinal reduziu os níveis de IgG anti-antígenos intestinais em animais $Fc\gamma RIIb^{-/-}$

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ADCC**- Citotoxicidade dependente de anticorpo
- AIHA**- Anemia hemolítica auto-imune
- AMS**- Artéria mesentérica superior
- ATP**- Trifosfato de adenosina
- BCR**- Receptor de célula B
- CXCL()**- quimiocina da família CXC
- DAMP** - *damage-associated molecular pattern* – padrão molecular associado a dano tecidual
- DC**- Célula dendrítica
- DNA**- Ácido desoxirribonucleico
- ELISA** - *enzyme linked immunosorbent assay* – ensaio imunossorvente ligado a enzima
- FcR** - receptor de porção Fc de imunoglobulina
- GF** - *germ free* – animais isentos de microrganismos
- IgA** - imunoglobulina A
- IgG** - imunoglobulina G
- IgM** - imunoglobulina M
- IL-()** - Interleucina - ()
- IRI**- Isquemia e reperfusão intestinal
- ITAM**- Motivo de ativação baseado em tirosina
- ITIM**- Motivo de inibição baseado em tirosina
- LXA4** - lipoxina A4
- MAMP** - *microorganism-associated molecular pattern* – padrão molecular associado a microrganismos
- MNM**- Miosina não muscular
- MPO** – mieloperoxidase
- NLR**- receptores do tipo NOD
- OD** - optical density – densidade óptica
- OPD** - *o-phenylenediamine dihydrochloride* – diidrocloreto de o-fenilenediamina

PAMP - *pathogen-associated molecular pattern* – padrão molecular associado a patógenos

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

PI3K- Fosfatidilinositol 3-quinase

PGE2- Prostaglandina E2

PRR- Receptor de reconhecimento padrão

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SDH- Succinato desidrogenase

TLR() - receptor do tipo *Toll* ()

TNF- α - *tumor necrosis factor-alfa* – fator de necrose tumoral alfa

WT - *wild type* – selvagem

$\mu\text{g/mL}$ - micrograma por mililitro, unidade de medida de concentração

μL - microlitro – unidade de volume

% - por cento

1 JUSTIFICATIVA

A resposta inflamatória pode ser definida como uma resposta protetora do organismo à diversos estímulos como, invasão de patógenos ou sinais endógenos, como células danificadas, resultando na eliminação da causa inicial da lesão. No entanto, uma resposta inflamatória exacerbada pode acarretar em prejuízos ao hospedeiro, como o que acontece na lesão por isquemia e reperfusão intestinal. Uma vez que a resposta inflamatória exacerbada está associada a alta letalidade da IRI (60% a 80%), muitos esforços têm sido feitos para um melhor entendimento dos mecanismos e moléculas que estão envolvidos nesse processo, para que se possa desenvolver estratégias terapêuticas que contenham ou diminuam a resposta lesiva após IRI.

Um dos componentes inflamatórios que tem sido demonstrado como de extrema importância para essa resposta inflamatória são os anticorpos naturais, já que estes anticorpos podem se depositar no intestino lesado após IRI, ativando a via do complemento e levando ao dano tecidual. Trabalhos do nosso grupo têm demonstrado que a microbiota intestinal exerce papel relevante ao promover a produção de auto anticorpos importantes para a lesão de reperfusão. No entanto, ainda não se sabe quais os mecanismos envolvidos na exacerbação da lesão associada à IRI por esses anticorpos. Diante disso, torna-se importante avaliar a participação dos receptores de imunoglobulinas, $Fc\gamma$, na patogênese da IRI, uma vez que estes receptores participam dos mecanismos efetores desencadeados por auto anticorpos em diversas doenças autoimunes, controlando a resposta inflamatória.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A resposta inflamatória

A inflamação pode ser definida como uma resposta protetora do organismo frente a estimulação, seja por patógenos invasores ou por sinais endógenos, como lesão tecidual, e que visa restaurar a homeostase das estruturas atingidas, tendo, portanto, um papel crucial na fisiologia de organismos mamíferos (MEDZHITOV, 2008). Essa resposta inflamatória é coordenada por complexas redes reguladoras, as quais são didaticamente divididas em categorias funcionais, denominadas indutores, sensores, mediadores e efetores da inflamação. Os indutores são os sinais que iniciam a resposta inflamatória, uma vez que ativam os sensores especializados responsáveis por induzir a produção de um conjunto específico de mediadores. Os indutores da inflamação podem ser divididos em dois grandes grupos, os indutores exógenos e os indutores endógenos. Os indutores exógenos podem ser tanto de origem microbiana, como fatores de virulência e os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), quanto de origem não microbiana, como compostos tóxicos e alérgenos (MEDZHITOV, 2008; NETEA *et al.*, 2017). Já os indutores endógenos da inflamação são sinais produzidos por tecidos danificados, como no caso de lesão tecidual estéril (não infecciosa), onde substâncias endógenas, chamadas alarminas, são liberadas pelo tecido atingido. Exemplos destas substâncias podem ser substâncias intracelulares (como ATP e K⁺), proteínas intracelulares como o HMGB1, proteínas de matriz extracelular degradadas, cristais (como cristais de ácido úrico), produtos finais de glicosilação avançada e lipoproteínas oxidadas (CISALPINO, 2015).

Os indutores exógenos (PAMPs) e endógenos (DAMP's) são responsáveis por ativar receptores PRRs (receptores de reconhecimento de padrões) que são amplamente conhecidos como sensores da resposta inflamatória. Dentre os PRRs podemos

destacar os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores do tipo NOD (NLRs), que são expressos em diversos leucócitos como neutrófilos, macrófagos, monócitos e células dendríticas (NETEA *et al.*, 2017). Após a ativação dos sensores pelos indutores, uma série de mediadores como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas e lipídeos serão liberados. Esses mediadores, por sua vez, alteram os estados funcionais de tecidos e órgãos (que são os efetores da inflamação) de forma que consigam se adaptar às condições indicadas pelo indutor da inflamação (Figura 1) (MEDZHITOV, 2008)

A resposta inflamatória aguda envolve a migração de componentes do sangue (plasma e leucócitos) para o sítio da infecção (ou lesão). O reconhecimento inicial desse processo é mediado por macrófagos teciduais e mastócitos, os quais levam à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas. Como consequência, ocorre a formação de um exsudato inflamatório local, formado principalmente pelo extravasamento de neutrófilos do sangue para o tecido em questão (BARTON, 2008). Uma vez no tecido afetado, os neutrófilos tornam-se ativos e são responsáveis por eliminar os agentes invasores, através da liberação do conteúdo tóxico dos seus grânulos, os quais incluem espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase 5. Esses efetores altamente potentes não discriminam entre alvos microbianos e do hospedeiro, o que pode levar a danos inevitáveis aos tecidos do hospedeiro. Uma resposta inflamatória aguda bem-sucedida resulta na eliminação dos agentes danosos, seguido por uma fase de resolução e de reparação tecidual, a qual é mediada principalmente por células teciduais residentes e macrófagos recrutados (SERHAN & SAVILL, 2005).

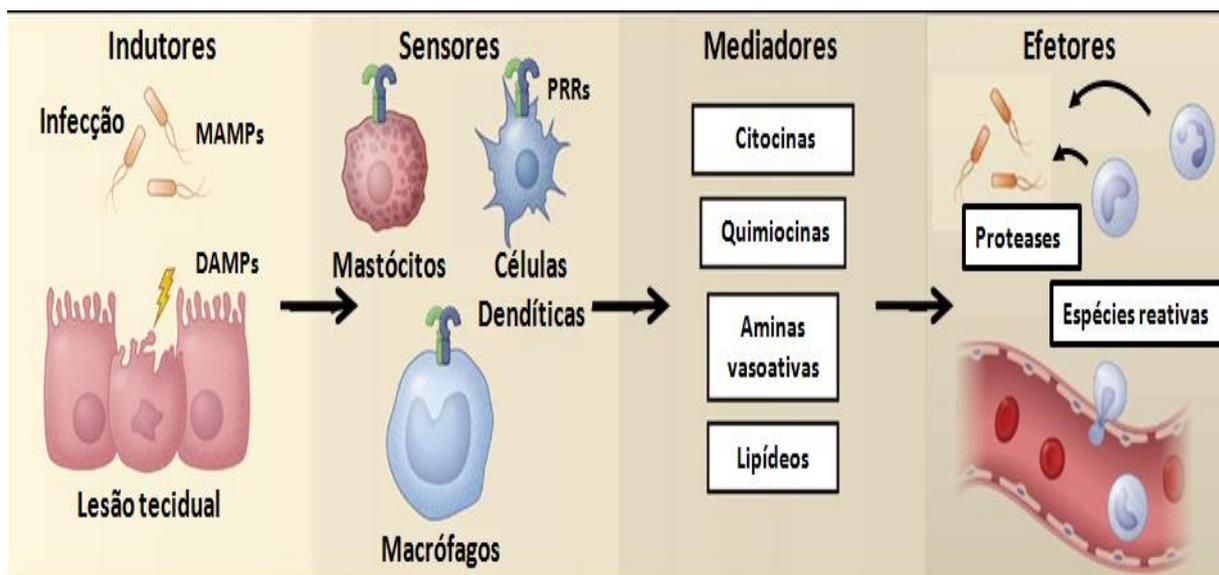


Figura 1- Componentes da resposta inflamatória: O processo inflamatório consiste de indutores, sensores, mediadores e efetores, os quais determinam o tipo de resposta. Os indutores de inflamação podem ser classificados como endógenos (derivados de células, tecidos, plasma ou de componentes da matriz extracelular) ou exógenos (MAMPs, compostos tóxicos, alérgenos e fatores de virulência) e são responsáveis por ativar os receptores especializados (sensores) associados à indução da expressão de mediadores específicos (citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, enzimas proteolíticas, lipídeos e fragmentos dos componentes do complemento). Já os efetores de uma resposta inflamatória são os tecidos e células, nos quais os estados de funcionamento são especificamente afetados pelos mediadores inflamatórios. Adaptado de MEDZHITOV, 2008.

Desta forma, percebe-se que o desenvolvimento de uma resposta inflamatória apropriada é essencial para o hospedeiro. Dado o potencial lesivo da resposta inflamatória e a importância da inflamação para a manutenção da homeostase do hospedeiro, vários mecanismos de controle da resposta inflamatória foram desenvolvidos ao longo da história evolutiva de metazoários complexos. Neste contexto, diversos trabalhos do nosso grupo têm demonstrado que a microbiota intestinal parece exercer impacto profundo na forma como o hospedeiro desencadeia uma resposta inflamatória frente a estímulos de origem infecciosa ou estéril, tais quais a infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae* (Fagundes *et al.*, 2012) ou a inflamação intestinal induzida por isquemia e reperfusão intestinal (Souza *et al.*, 2004).

2.2 A microbiota intestinal

Imediatamente após o nascimento, os mamíferos iniciam um longo processo de colonização por microrganismos (bactérias, archaeas, vírus e eucariotos

unicelulares) que colonizam as superfícies mais expostas como pele, boca, intestino e vagina (ROUND; MAZMANIAN, 2009; WINTER; LOPEZ; BÄUMLER, 2013). O trato gastrointestinal é o sistema mais amplamente colonizado, abrigando trilhões de bactérias simbiotes benéficas, chegando a ter uma população composta por cerca de 500 a 1000 espécies distintas (BRESTOFF & ARTIS 2013). No entanto, podemos observar que ao longo do trato gastrointestinal essa microbiota sofre alterações tanto em abundância quanto em diversidade, sendo que na porção terminal do intestino encontramos cerca de 10^{13} a 10^{14} microrganismos (ECKBURG *et al.*, 2005; SEKIROV *et al.*, 2010; FORBES *et al.*, 2016; BUDDEN *et al.*, 2016).

Em relação a sua composição, os anaeróbios obrigatórios compreendem a maior parte da microbiota intestinal em adultos (MAHOWALD *et al.*, 2009) e, por mais que a microbiota intestinal de cada indivíduo seja única em níveis de espécies e gênero, ela é altamente conservada em nível de filo, sendo composta principalmente por três filos: Firmicutes, Bacteroidetes, e Proteobacteria (BÄUMLER & SPERANDIO, 2016; ECKBURG *et al.*, 2005; LAY *et al.*, 2005). O filo Firmicutes é a divisão mais numerosa e diversa encontrada no intestino (GUARNER, 2012). É composto predominantemente por bactérias Gram-positivo, anaeróbias obrigatórias e formadoras de esporos, sendo representadas principalmente por espécies da classe Clostridia em humanos, e pelo gênero *Lactobacillus* em camundongos (ECKBURG *et al.*, 2005, FUNG *et al.*, 2014). Dentre o filo dos Bacteroidetes, o gênero *Bacteroides* está altamente representado ao longo do trato GI dos mamíferos, atingindo uma concentração de 10^{10} - 10^{11} microrganismos por grama de fezes. Dentre os muitos membros do gênero *Bacteroides*, espécies como *B. thetaiotaomicron* e *B. fragilis*, estão bem adaptados ao trato gastrointestinal e são descritos como importantes para auxiliar no metabolismo do hospedeiro, processando polissacarídeos complexos em compostos menores para absorção pelo hospedeiro. De forma subdominante, encontramos o filo Proteobacteria, que é formado por bactérias Gram-negativo, da família Enterobacteriaceae, representada pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, e, apesar de estarem em menor quantidade na microbiota intestinal, o aumento do número de representantes desse grupo está conhecidamente associado com diversas doenças

inflamatórias intestinais (WINTER & BÄUMLER, 2014; WINTER; LOPEZ; BÄUMLER, 2013)

A microbiota intestinal indígena frequentemente é considerada como um órgão adicional ao corpo humano que, em condições fisiológicas normais, é responsável por três principais funções: resistência a colonização de patógenos, contribuição nutricional e imunomodulação (SCHUIJT *et al.*, 2013; BRESTOFF *et al.*, 2013; SHREINER *et al.*, 2015).

No trato gastrointestinal, a função imunomoduladora da microbiota intestinal se dá através do reconhecimento de estruturas moleculares denominadas padrão moleculares associado a microrganismos (MAMPS), dentre os quais podemos citar, lipopolissacarídeos, flagelinas, peptidoglicanos e ácidos nucleicos pelos PRRs, incluindo TLRs e NLRs, que são expressos por várias células intestinais, orquestrando uma resposta imune reguladora com a produção de produtos antimicrobianos e liberação de citocinas e quimiocinas, que são cruciais para a defesa do hospedeiro (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010; ROOKS & GARRETT, 2016). Além disso, essa atividade imunomoduladora faz com que a microbiota intestinal exerça papel importante no desenvolvimento de tecidos linfóides associados ao intestino, na diferenciação de células T intestinais e na secreção de IgA (MCCOY; RONCHI; GEUKING, 2017)

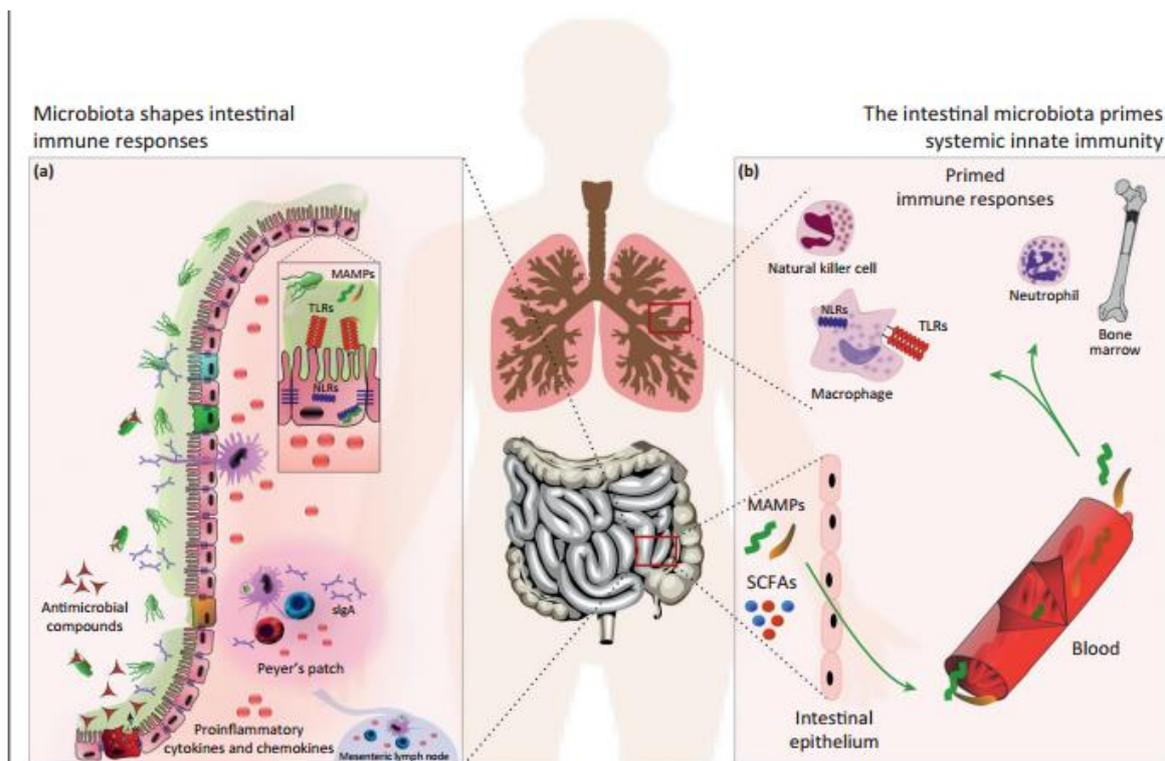


Figura 2- Maturação do sistema imune local e sistêmico pela microbiota intestinal: A Microbiota intestinal expressa estruturas moleculares denominadas MAMPs que são reconhecidos pelos PRRs, incluindo TLRs e NLRs. O reconhecimento de metabolitos e MAMPs por PRRs de células intestinais orchestra uma resposta imune que resulta em uma liberação contínua de mediadores inflamatórios, compostos antimicrobianos e formação de uma camada de muco. Produtos derivados da microbiota, incluindo nutrientes, ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) e MAMPs são translocados do intestino, alcançando a circulação sistêmica e maturando células imunes em sítios distantes. Fonte: SCHUIJT *et al.*, 2013.

A influência da microbiota intestinal no sistema imune não se restringe apenas ao intestino. MAMPs, como o peptideoglicano, nutrientes e metabólitos podem atravessar a barreira epitelial intestinal e maturar células do sistema imune inato e adaptativo em compartimentos sistêmicos, estimulando por exemplo a produção de imunoglobulinas G (Figura 2) (ROOKS; GARRETT, 2016; SCHUIJT *et al.*, 2013).

2.2.1 A microbiota intestinal e as imunoglobulinas

A IgA é a principal imunoglobulina encontrada na superfície da mucosa intestinal, onde as suas principais funções são a neutralização de vírus na mucosa, impedimento da translocação bacteriana para a lâmina própria e controle da composição da microbiota intestinal (LYCKE & BEMARK, 2017). A produção da IgA na mucosa pode ser induzida por dois mecanismos distintos, sendo um independente de células T e o outro dependente de células T, onde as placas de

Peyer são o local principal para a indução da produção dessa imunoglobulina. A microbiota intestinal exerce papel fundamental na indução da IgA, sendo que a secreção de IgA dependente de células T é induzida principalmente contra bactérias da microbiota intestinal que estão mais intimamente associados ao epitélio intestinal, como bactérias filamentosas segmentadas (SFB) e *Mucispirillum* (MCCOY; RONCHI; GEUKING, 2017).

Além de induzir a produção de imunoglobulinas na mucosa, a colonização intestinal também induz a produção de IgG sistêmico. O importante papel da microbiota na indução da produção de anticorpos tem sido amplamente estudado através do uso de animais isentos de germe, onde foi demonstrado que estes animais apresentam menor concentração de IgG circulantes e que essa menor concentração pode ser revertida através da convencionalização desses animais com fezes oriundas de animais convencionais (MCCOY; RONCHI; GEUKING, 2017; CISALPINO *et al.*, 2017).

Em adição, a microbiota também participa da montagem do repertório de IgG do hospedeiro. Um trabalho recente demonstrou que em condições homeostáticas, bactérias simbióticas Gram-negativo são capazes de quebrar a barreira epitelial intestinal e se disseminar sistemicamente para induzir uma produção de IgG específica contra bactérias fecais. Essa IgG induzida pela microbiota apresenta uma relevância funcional, uma vez que a mesma foi capaz de fornecer proteção contra a translocação bacteriana após o dano intestinal induzido por DSS. De forma interessante, os autores também identificaram que a Lipoproteína mureína (MLP), uma proteína de membrana externa altamente conservada de enterobactérias, é o principal alvo de reconhecimento da IgG (ZENG *et al.*, 2016). Um outro trabalho do nosso grupo também demonstrou que os anticorpos induzidos pela microbiota são importantes para a responsividade do hospedeiro frente não apenas a estímulos inflamatórios infecciosos, como a infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*, mas também frente a lesão inflamatória estéril que ocorre durante a isquemia e reperfusão intestinal (CISALPINO *et al.*, 2017).

2.2 A lesão induzida por isquemia e reperfusão intestinal

A isquemia intestinal é uma condição grave associada a diversas condições clínicas, como enterocolite neonatal necrosante, isquemia mesentérica aguda, trauma, doença cardiopulmonar, choque hemorrágico e rejeição do transplante intestinal (GONZALES *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2009). Sua taxa de mortalidade é de aproximadamente de 60% a 80% e, apesar de representar apenas 1% a 2% dos problemas gastrointestinais, sua incidência está cada vez maior e muitas vezes seu diagnóstico é negligenciado (GONZALES *et al.*, 2015).

A isquemia intestinal é caracterizada pela diminuição ou interrupção da perfusão sanguínea no tecido intestinal, o que compromete o aporte de oxigênio para as células intestinais, diminuindo a produção de ATP e resultando em morte celular e dano tecidual (VOLLMAR e MENGER, 2011; GONZALES *et al.*, 2015). A opção terapêutica para revitalizar o tecido isquêmico é a restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão), seja por método cirúrgico ou pelo uso de agentes trombolíticos. Entretanto, apesar de necessária para restaurar as funções teciduais, a reperfusão do leito isquêmico intensifica o dano tecidual iniciado pela isquemia. Isso se deve ao fato de que os metabólitos resultantes do processo isquêmico, hipoxantina e xantina-oxidase, utilizam o abundante aporte de oxigênio oferecido pela reperfusão como acceptor final de elétrons, culminando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são importantes mediadores inflamatórios na patogênese da lesão de reperfusão (Figura 1). Durante a isquemia ocorre também o acúmulo de succinato no tecido intestinal, pela reversão da atividade da SDH (succinato desidrogenase). O succinato acumulado é rapidamente consumido na reperfusão pela normalização da atividade da SDH, produzindo grande quantidade de ROS mitocondrial que desempenha papel inicial na lesão induzida por IRI (CHOUCHANI *et al.*, 2014)

As ROS, conseqüentemente, reagirão com componentes celulares do tecido intestinal, levando assim a uma disfunção da barreira intestinal e lesão tecidual. Além disso, com a reperfusão, estes radicais livres também irão atingir a circulação sistêmica, levando a uma resposta inflamatória sistêmica e remota em órgãos distantes (KATADA *et al.*, 2015). Consoante a esse processo, essas ROS atuarão

também no recrutamento de neutrófilos, que são os primeiros leucócitos recrutados para o tecido inflamatório e exercem papel chave na lesão induzida por isquemia e reperfusão (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Já foi demonstrado em modelos murinos que a inibição dos processos de adesão, migração e ou recrutamento de neutrófilos abole a lesão tecidual induzida por IRI (HERNANDEZ, *et al.*, 1987; SOUZA *et al.*, 2000a; SOUZA *et al.*, 2000b; SOUZA *et al.*, 2004a; SOUZA *et al.*, 2004c). A participação dos neutrófilos na lesão induzida por IRI se dá pela indução da produção de mediadores, como eicosanóides (PGE2 e LTB4) e citocinas, que levarão ao recrutamento de mais leucócitos para o sítio inflamatório. Além disso, ocorre a liberação de substâncias a partir da degranulação dos mesmos, como radicais livres e enzimas proteolíticas (elastases, mieloperoxidase, metaloproteínas e protease-3) que degradarão componentes do tecido intestinal, levando à disruptura do tecido epitelial e ao aumento da permeabilidade intestinal, o que resulta em dano tecidual (Figura 3) (DALY *et al.*, 2016).

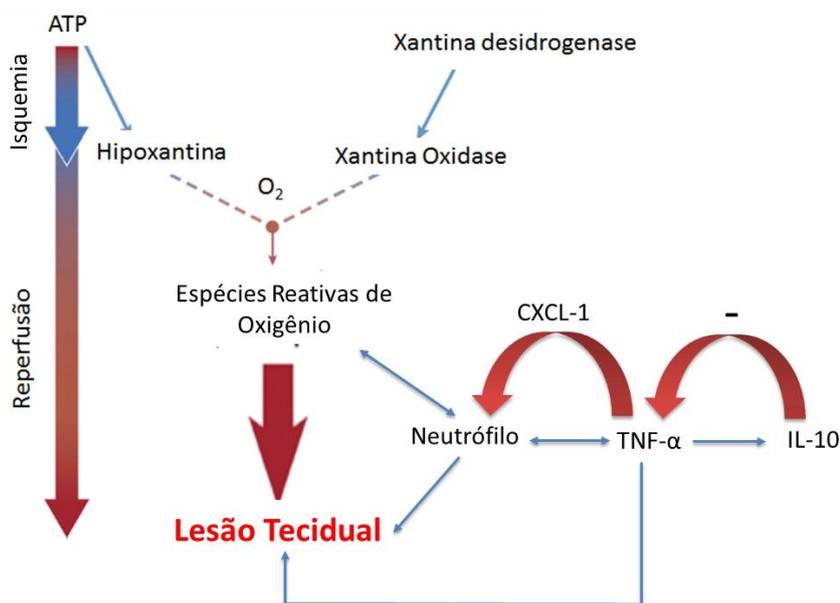


Figura 3- Mecanismo da lesão induzida por isquemia e reperfusão intestinal: Durante a isquemia intestinal ocorre a degradação dos estoques de ATP para a produção de energia, o que leva a um aumento nos níveis intracelulares de hipoxantina. Paralelamente, durante a isquemia, ocorre também a conversão da xantina-deidrogenase, enzima que metaboliza a hipoxantina em xantina-oxidase. A xantina-oxidase depende do oxigênio para a metabolização da hipoxantina e, quando este é fornecido pela reperfusão, formam-se como subprodutos espécies reativas de oxigênio, que induzirão lesão tecidual. Esses radicais livres funcionarão também como um quimioatraente para neutrófilos, que além de contribuir para a lesão tecidual, induzem a produção de TNF- α que também terá importante papel na patogênese da IRI. Apesar dos neutrófilos serem importantes para a produção de TNF- α , essa citocina pode também induzir o influxo de neutrófilos, uma vez que induz a produção de quimioquinas, como CXCL-1, que são importantes quimioatraentes de neutrófilos. O

TNF- α também induzirá a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 que funcionará como um regulador negativo da lesão por reperfusão. (Adaptado de GONZALES *et al.*, 2015).

Dentre as citocinas induzidas pelos neutrófilos, podemos destacar a citocina TNF- α , que é um mediador essencial da inflamação intestinal e exerce papel importante na lesão e letalidade induzida por IRI (SOUZA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2004). O TNF- α pode também ser produzido por células residentes, como macrófagos, monócitos e células endoteliais, participando então, como um mediador inflamatório inicial. Na lesão induzida por IRI, esta citocina está envolvida com a produção de espécies reativas de oxigênio, no recrutamento de neutrófilos e na indução de apoptose celular e outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6 e IL-10 (SOUZA *et al.*, 2001a; YANG *et al.*, 2013). A citocina IL-10 possui um papel anti-inflamatório importante na lesão de reperfusão. Uma vez que esta citocina é capaz de inibir o influxo de neutrófilos e a produção de outras citocinas, como por exemplo o TNF- α , inibindo a lesão tecidual induzida por IRI (SOUZA *et al.*, 2003).

Outro componente que participa da lesão induzida por reperfusão são os linfócitos B (Chan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009). Trabalho anterior do nosso grupo demonstrou que animais deficientes na cadeia μ , importante fator para a diferenciação de células pré-B em células B, apresentaram menor resposta inflamatória após IRI. Estes animais apresentaram menor produção de mediadores pró-inflamatórios e menor recrutamento de neutrófilos para o tecido intestinal, apresentando assim atenuação da letalidade induzida por IRI (CISALPINO *et al.*, 2017). Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, sendo que parte desses anticorpos são reativos a antígenos bacterianos e auto-antígenos, como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e fosfolípidios, e desempenham papel importante na lesão induzida por IRI (FLEMING, 2006; BOES, 2000; PANDA & DING, 2015). Chan e colaboradores 2004, demonstraram que animais isentos de anticorpos circulantes apresentam atenuação na lesão induzida por IRI e a reposição de anticorpos nesses animais foi capaz de restabelecer o fenótipo apresentado por eles. Outro fato que aponta as imunoglobulinas como importantes mediadores da resposta inflamatória induzida por IRI é a ocorrência de deposição de anticorpos do tipo IgG e IgM sobre as células epiteliais no tecido intestinal após IRI, o que funciona como um importante indutor da resposta inflamatória (WILLIAMS, 1999; ANDERSON *et al.*, 2005; CISALPINO *et al.*, 2017). O papel destas imunoglobulinas na patogênese da

isquemia e reperfusão intestinal está relacionada ao fato de que esses anticorpos são capazes de se ligar a neoantígenos (DNA, miosina não muscular e anexina IV) que são expressos nas células danificadas após a isquemia intestinal e ativar a via do complemento, desencadeando uma intensa resposta inflamatória (WILLIAMS *et al.*, 1999; ANDERSON *et al.*, 2005; FLEMING, 2002; FLEMING, 2006; POPE, 2016).

A microbiota intestinal também exerce papel importante no controle da resposta inflamatória frente a IRI. Dados prévios do nosso grupo demonstraram que animais isentos de germes apresentaram menor resposta inflamatória local, remota e sistêmica após IRI. Estes animais apresentaram menor recrutamento de neutrófilos e menor lesão tecidual, fazendo com que estes animais apresentassem menor letalidade induzida por IRI. No entanto, a menor lesão tecidual e letalidade encontrada nestes animais foi revertido pela injeção de anticorpos anti-IL10 antes da reperfusão, demonstrando que a hiporresponsividade desses animais está associada à sua capacidade de produzir endogenamente altas concentrações de IL-10 (SOUZA *et al.*, 2004b). A produção de IL-10 nos animais GF está associada a secreção de lipoxina A4 (LXA4) e anexina 1 (ANXA-1). O bloqueio da síntese de LXA4 com um inibidor da 5-lipoxigenase ou o bloqueio da ANXA-1 com um anticorpo anti-ANXA-1 preveniram parcialmente o aumento de IL-10 nos animais GF após submissão a isquemia e reperfusão intestinal (SOUZA *et al.*, 2007), sugerindo que a secreção de IL-10 nos animais GF é secundária a produção de LXA4 e ANXA-1. Além disso, também foi demonstrado que após a reposição da microbiota (convencionalização), a hiporresponsividade inflamatória observada nos animais GF é revertida, fazendo com que estes animais apresentem intensa resposta inflamatória frente a IRI (SOUZA *et al.*, 2004b).

De maneira interessante, outro trabalho do nosso grupo demonstrou que a hiporresponsividade apresentada por camundongos GF frente a IRI pode ser revertida através da reposição de anticorpos oriundos de animais convencionais (CV). Cisalpino e colaboradores (2017), demonstraram que camundongos GF que receberam soro ou anticorpos purificados de animais CV e foram submetidos a IRI apresentaram extravasamento plasmático e influxo de neutrófilos para o tecido intestinal, produção de TNF- α , tanto localmente quanto sistemicamente, e intensa

lesão tecidual, o que culminou em alta taxa de letalidade desses animais. Animais GF que receberam soro de animais CV também apresentaram deposição de IgG no tecido intestinal após IRI, o que não foi observado em animais GF que receberam soro de animais GF. Em adição, a transferência de soro ou de imunoglobulinas de animais CV para animais GF foi também capaz reverter as quantidades de mRNA de ANXA-1 e IL-10 após a IRI, sugerindo que a deposição de IgG no tecido intestinal é responsável por desligar os mecanismos anti-inflamatórios em animais GF que receberam a reposição de imunoglobulinas. Dessa forma, os achados do trabalho demonstram que a produção de anticorpos auto reativos é promovido pela colonização pela microbiota intestinal e que esses anticorpos são essenciais para lesão intestinal induzida por IRI. No entanto, ainda não se sabe quais os mecanismos envolvidos na promoção da lesão de reperfusão pelos anticorpos depositados no tecido.

2.3 A imunoglobulina G (IgG) e os seus receptores FcγR

A IgG é uma das proteínas mais abundantes do soro humano, compreendendo aproximadamente 10% a 20% das proteínas plasmáticas e representa 75% das imunoglobulinas circulantes no plasma (QUAST & LÜNEMANN, 2014). As imunoglobulinas circulantes são produzidas pelas células B e são importantes para a defesa contra patógenos (FLEMING *et al.*, 2002; FLEMING *et al.*, 2004) e estão envolvidas em diversos mecanismos efetores do sistema imunes como, citotoxicidade, fagocitose e liberação de diversos mediadores inflamatórios (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014). Em relação à sua estrutura molecular (Figura 4), a IgG é composta por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias γ pesadas (H) e duas cadeias κ ou λ leves (L). Cada cadeia pesada é composta por um domínio N-terminal variável (VH) e três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3) com uma região de dobradiça entre CH1 e CH2. As cadeias leves consistem de um domínio N-terminal variável (VL) e um domínio constante (CL). As cadeias VH e CH1 se associam para formar um braço Fab (fragmento de ligação ao antígeno) que é responsável pela interação altamente específica entre a IgG e antígenos. Já a região do anticorpo formada pela região de dobradiça inferior e os domínios CH2 / CH3 é denominada de "Fc" ("fragmento cristalino") (BOURNAZOS & RAVETCH, 2017;

SCHWAB & NIMMERJAHN, 2013; VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014). O domínio Fc pode ser encontrado em duas conformações dependendo do tipo de glicano que está associado a ele, o estado aberto e o estado fechado. A alteração do estado conformacional em que o domínio Fc se encontra está intimamente relacionado com a sua capacidade de interagir com as duas categorias do receptor FcγR (BOURNAZOS; RAVETCH, 2015).

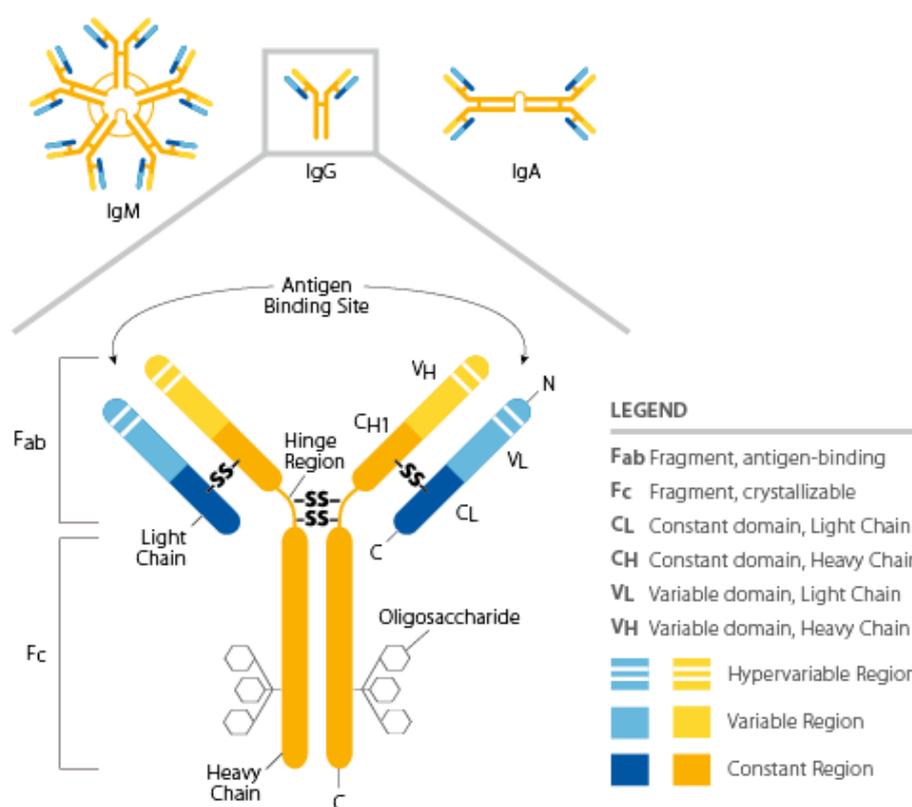


Figura 4 - Estrutura molecular da imunoglobulina G :Fonte: <http://www.medical-labs.net/category/immunology/>

Os FcγRs são glicoproteínas de membrana do tipo I, sendo receptores para o fragmento cristalino das IgG. Os FcγRs são normalmente categorizados em dois tipos: receptores FcγR do tipo I e do tipo II. Os receptores FcγR de tipo I incluem os receptores canônicos que incluem os receptores FcγRIII e FcγRIIB e podem ser ativados pela porção Fc apenas na conformação aberta. Por outro lado, os FcγR de tipo II, que incluem os receptores de lectina do tipo C, como CD23 e DC-SIGN, exibem alta afinidade para a conformação fechada (BOURNAZOS; RAVETCH, V., 2015, 2017).

Os receptores FcγR do tipo I, após serem ativados pela IgG, exercem uma série de funções pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, fazendo com que esses receptores exerçam um papel central na regulação do sistema imune (NIMMERJAHN e RAVETCH, 2008; TAKAI, 2005; BRUHNS, 2012). Os FcγR são amplamente expressos em todas as células mieloides do sistema hematopoiético, porém cada tipo celular expressa diferentes receptores em sua superfície. Por exemplo, células efetoras imunes inatas (monócitos, macrófagos, neutrófilos, DCs, basófilos e mastócitos) apresentam em sua superfície tanto FcγRs de ativação quanto de inibição. Nos neutrófilos de camundongos, encontramos principalmente FcγRIIB e FcγRIII e nas células dendríticas encontramos principalmente FcγRI, FcγRIIB e FcγRIII. Apenas dois tipos celulares não expressam simultaneamente receptores de ativação e inibição: as células NK expressam apenas o receptor de ativação FcγRIII e as células B expressam apenas o receptor inibidor FcγRIIB (NIMMERJAHN & RAVETCH, 2008). Além disso, Moreno-Fierros e colaboradores, 2015, demonstraram que células epiteliais do tecido intestinal também expressam os receptores FcγRIII e FcγRII.

Tradicionalmente, classifica-se os FcγRs do tipo I de duas formas: pelo tipo de sinalização que desencadeia (receptores de ativação e inibição) e pela diferente afinidade destes receptores pelas subclasses de IgG (alta ou baixa afinidade). Em camundongos foram identificados três tipos de receptores de ativação: FcγRI, FcγRIII, FcγRIV, um receptor de inibição FcγRIIB e um receptor FcRn envolvido na reciclagem e transporte de IgG. Já em humanos, são descritos 7 diferentes tipos de FcγRs (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB e FcγRn) (BRUHNS, 2012).

2.3.1 O receptor de ativação FcγRIII

O receptor FcγRIII é um receptor de ativação de baixa afinidade para as subclasses de IgG: IgG1, IgG2a e IgG2b e é o único receptor de ativação onde se liga a subclasse IgG1 (BRUHNS, 2012). Este receptor exerce papel chave na resposta inflamatória de várias doenças autoimunes (NIMMERJAHN & RAVETCH, 2008).

Diferentes grupos de pesquisas têm demonstrado que animais deficientes para FcγRIII apresentaram atenuação da resposta inflamatória induzida por imunocomplexos em doenças autoimunes como, vasculite, anafilaxia cutânea, reação de Arthus, anemia hemolítica autoimune (AIHA) e na glomerulonefrite (HAZENBOS *et al.*, 1996; MEYER *et al.*, 1998; SCHILLER *et al.*, 2000; COXON *et al.*, 2001; TAKAI, 2002).

O receptor FcγRIII possui acoplado a ele uma subunidade adaptadora contendo motivos ITAM (imunorreceptor de ativação baseado em tirosina), uma vez que os FcγR de ativação não são capazes de ativar a via de sinalização autonomamente (RAVETCH & BOLLAND, 2001). Após a ligação do imunocomplexo no receptor FcγRIII, ocorrerá o início da via de sinalização (Figura 5). Para isso, primeiramente, resíduos de tirosina presentes nos domínios ITAM serão fosforiladas por cinases da família SRC. Após a fosforilação, os domínios ITAM fosforilados servirão como um local de encaixe para o domínio SH2, que é um domínio de ancoragem da proteína cinase citosólica SYK, que ativará outras moléculas de transdução de sinal, como a fosfoinositol 3-cinase (PI3K) e SOS, do inglês “Son of sevenless homologue”. A ativação da molécula SOS também leva a ativação de outras vias que também resultam na ativação celular. A ativação da PI3K leva a geração de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato que recruta tirosina cinase de Bruton (BTK) e fosfolipase Cγ (PLCγ), o que leva à ativação de cinases e à liberação de cálcio a partir do retículo endoplasmático (Figura 5). A ativação celular desencadeada pela ativação desse receptor irá resultar na ativação de diversas respostas imunes como liberação de citocinas, ADCC por células NK e a degranulação de mastócitos (BOURNAZOS & RAVETCH, 2017; NIMMERJAHN & RAVETCH, 2008; TAKAI, 2002).

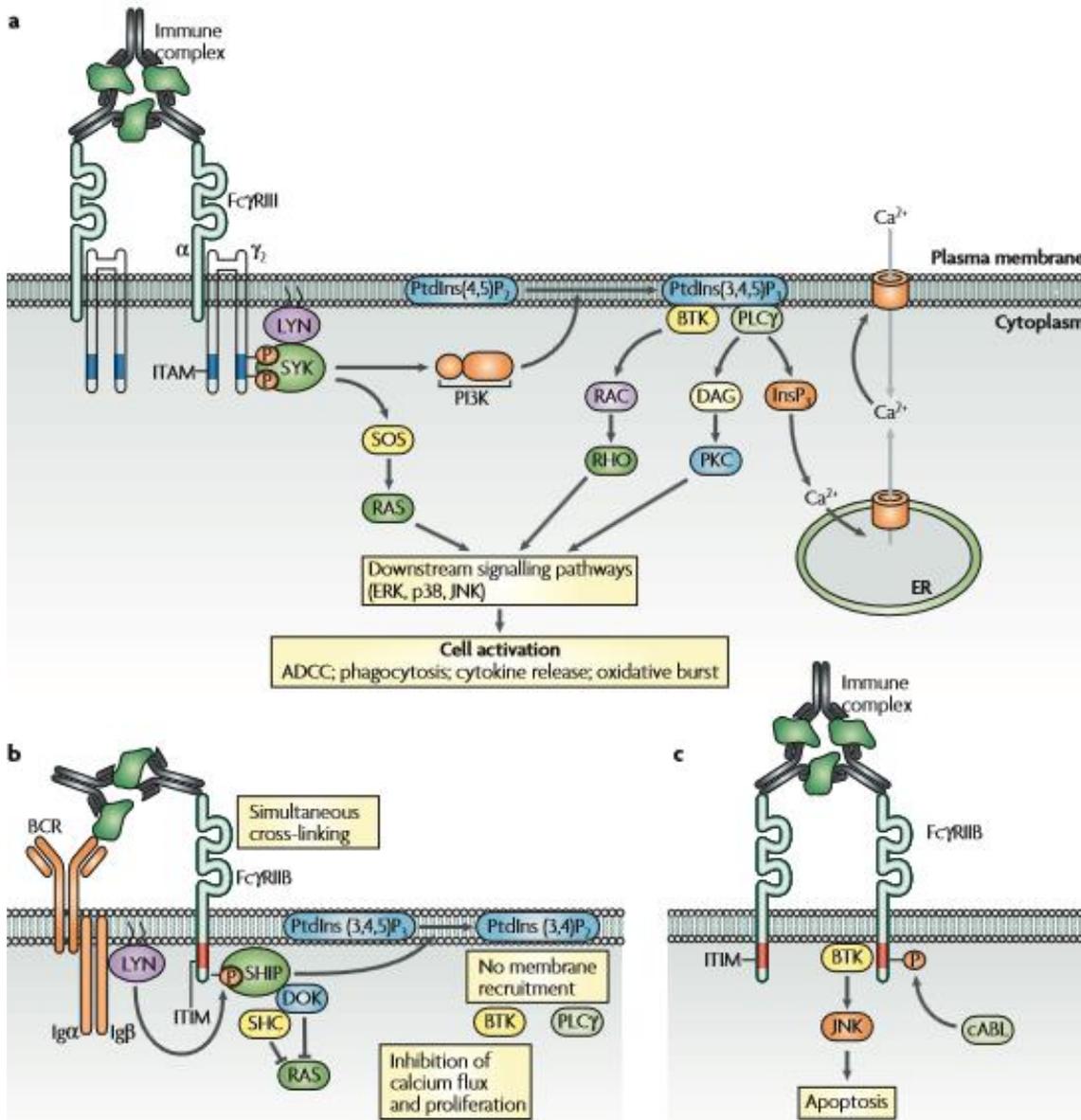


Figura 5 - Vias de sinalização dos Fc γ Rs de ativação e inibição: (a) Via de sinalização de receptores de ativação. (b) via de sinalização dependente de ITIM por receptores inibidores. (c) via de sinalização independente de ITIM por receptores inibidores. Fonte: NIMMERJAHN E RAVETCH (2008), p. 39.

2.3.2 O Receptor de inibição Fc γ RIIB

O receptor Fc γ RIIB é o único receptor inibidor da família dos receptores Fc γ do tipo I e se liga com baixa afinidade às subclasses de IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b (RAVETCH & BOLLAND, 2001). Esse receptor é o único encontrado nas células B, onde exerce importante papel na tolerância das células B, regulando a produção de autoanticorpos (BOURNAZOS; RAVETCH, JEFFREY V., 2015, 2017). O Fc γ RIIB também é encontrado nas células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, macrófagos e

basófilos. Nestas células, o receptor FcγRIIB exerce a função de inibir as funções dos FcγRs de ativação, como inibição da fagocitose e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Já nas células dendríticas, esse receptor possui a função importante de capturar complexos imunes (SMITH & CLATWORTHY, 2010). O receptor FcγRIIB exerce um importante papel em doenças autoimunes e inflamatórias, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e na síndrome de *Goodpasture* (TAKAI, 2005), regulando tanto a resposta imune adaptativa quanto a resposta imune inata (ESP; SMITH, K. G. C., 2016). Em modelos animais, foi demonstrado que a ausência de FcγRIIB contribui para o agravamento destas doenças, demonstrando que este receptor é importante para suprimir a resposta inflamatória em doenças autoimunes (NAKAMURA *et al.*, 2000; SMITH & CLATWORTHY, 2014; TAKAI, 2005; YUASA *et al.*, 1999). Yuasa e colaboradores (1999) demonstraram que a deleção do receptor FcγRIIB em camundongos que não eram permissíveis à artrite reumatoide tornou estes camundongos susceptíveis à artrite, com liberação de mediadores pró-inflamatórios e lesão tecidual. Além disso, Nakamura e colaboradores 2000, mostraram que animais FcγRIIB^{-/-} desenvolveram pneumonia hemorrágica maciça, com infiltrado de neutrófilos e macrófagos e intensa glomerulonefrite em um modelo de síndrome de *Goodpasture*. Além de exercer importante papel em doenças autoimunes, esse receptor também está envolvido na regulação da resposta inflamatória pulmonar na asma alérgica (DHARAJIYA *et al.*, 2010)

No interior do domínio citoplasmático, o receptor FcγRIIB apresenta motivos imunorreceptor baseado em tirosina de inibição (ITIM) e as funções inibidoras exercidas pelo FcγRIIB podem ser dependentes ou independentes desses motivos (Figura 5). Nos eventos dependentes de ITIM, o primeiro passo da cascata de sinalização será a fosforilação dos ITIM, que resultará no recrutamento das fosfatases SHIP (inositol polifosfato 5'fosfatase contendo o domínio SH2) e SHP1 (proteína tirosina-fosfatase contendo domínio SH2). Essas fosfatases irão interferir na ativação de vias de sinalização por hidrólise inositol-3-fosfato, impedindo o recrutamento de cinases contendo o domínio PH, tais como BTK ou PLCγ, para a membrana celular. Isso irá diminuir os níveis intracelulares de cálcio. Assim, processos dependentes de cálcio como degranulação, fagocitose, ADCC e liberação

de citocinas pró-inflamatórias são impedidos (ESP & SMITH, 2016; NIMMERJAHN, 2005; RAVETCH & BOLLAND, 2001)

Além da função de inibir as respostas imunes desencadeadas por receptores de ativação descritas anteriormente, o receptor FcγRIIB também desempenha papel importante na regulação da produção de anticorpos, através da mediação do fenômeno denominado retroalimentação de anticorpos. Neste fenômeno, antígenos se ligam simultaneamente ao receptor do tipo BCR e a anticorpos secretados que se ligam ao receptor FcγRIIB, desencadeando uma via de sinalização dependente de ITIM, onde a fosfatase SHIP converte PIP₃ a PIP₂ bloqueando a sinalização das células B o que resulta na inibição da secreção de anticorpos (Figura 6) (ABBAS *et al.*, 2015). A importância fisiológica da inibição da produção de anticorpos mediada pelo FcγRIIB é demonstrada pela produção descontrolada de IgG observada em camundongos deficientes para o receptor FcγRIIB, fazendo com que estes camundongos sejam mais susceptíveis a doenças autoimunes como Lúpus e Síndrome de Goodpasture (ABBAS *et al.*, 2015; BOLLAND & RAVETCH, 2000). Além disso, a ligação simultânea de imunocomplexos em receptores FcγRIIB e receptores de célula B desencadeia uma via de sinalização independente de ITIM e SHIP controlando a apoptose de células B (RAVETCH & BOLLAND, 2001).

Tendo em vista o importante papel dos anticorpos na lesão de reperfusão e que nos demonstramos anteriormente que esses anticorpos são dependentes da microbiota a nossa hipótese é que os receptores Fcγ é um dos mecanismos efetores desencadeados pelos auto anticorpos nessa patologia inflamatória.

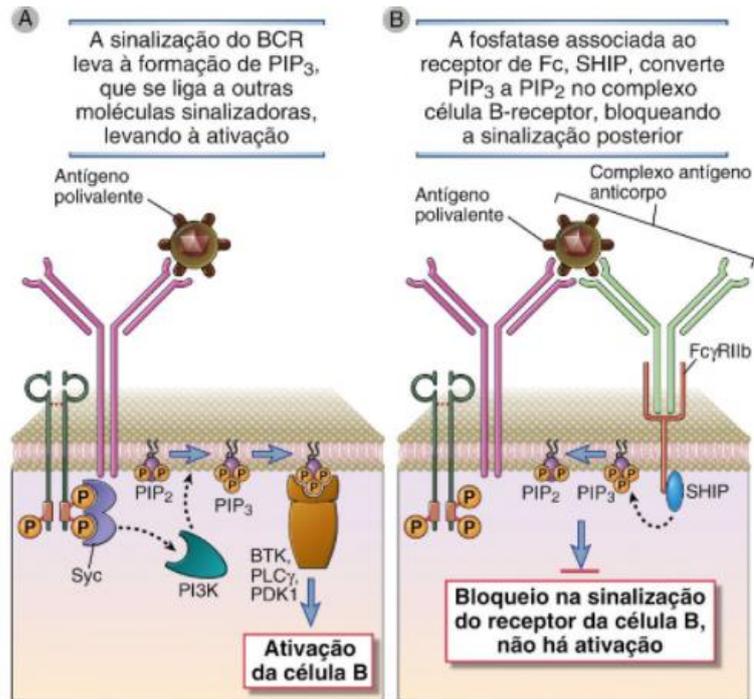


Figura 6- Regulação da produção de anticorpos pelo receptor Fc γ RIIb: (A) A ligação do complexo antígeno-anticorpo ao receptor de células B (BCR) leva a ativação de células B. (B) A ligação simultânea do imunocomplexo ao receptor BCR e ao receptor Fc γ RIIb induz a inibição da ativação de células B e por consequência a inibição da produção de anticorpos. Fonte: ABBAS *et al.*, 2015.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos receptores FcγRIII e FcγRIIB na inflamação intestinal induzida pela isquemia e reperfusão em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a cinética de deposição de IgG nos tecidos intestinais de animais submetidos a isquemia e reperfusão intestinal.
- 2) Avaliar o papel do receptor FcγRIII na resposta inflamatória e na mortalidade induzida por isquemia e reperfusão intestinal.
- 3) Avaliar o papel do receptor FcγRIIB na resposta inflamatória e na mortalidade induzida por isquemia e reperfusão intestinal.
- 4) Caracterizar o papel do receptor FcγRIIB no controle da produção de anticorpos anti-antígenos intestinais e anti-antígenos da microbiota intestinal.
- 5) Avaliar o papel da microbiota na indução acentuada de anticorpos anti-antígenos intestinais na ausência da ativação do receptor FcγRIIB.

4 METODOLOGIA

4.1 Indução da Isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior em camundongos (IRI)

Para a realização da IRI foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT), com deleção genética para o receptor FcγRIII ou FcγRIIb com idade entre oito e doze semanas. Os animais WT foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e os animais com deleção genética foram obtidos do biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos com livre acesso a comida e água, em ambiente com temperatura controlada e em ciclos claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal sob o protocolo 338-2016.

Para a indução da IRI, os camundongos foram anestesiados com 60µl de solução contendo xilazina 20mg e cetamina 100mg por via intraperitoneal e submetidos à laparotomia mediana com posterior exposição da artéria mesentérica (AMS). Para a indução da isquemia, a artéria mesentérica superior foi isolada e submetida a uma ligadura, com auxílio de linha e de um cateter de polietileno (PE-50), por 30 minutos. Durante esse período, os animais foram mantidos em uma placa aquecedora (a 36°C). Após esse período, o fluxo sanguíneo foi restabelecido (pelo corte e retirada da linha obstrutora, utilizando-se uma lâmina de bisturi) e os animais foram acompanhados para monitorar a porcentagem de sobrevivência por 24 horas. Em outro grupo experimental, os animais foram sacrificados com 1 hora, 3 horas ou 5 horas após a reperfusão da AMS. Animais falso-operados (sham) foram utilizados como controle experimental. Estes animais foram anestesiados e laparotomizados, sem que houvesse oclusão da AMS.

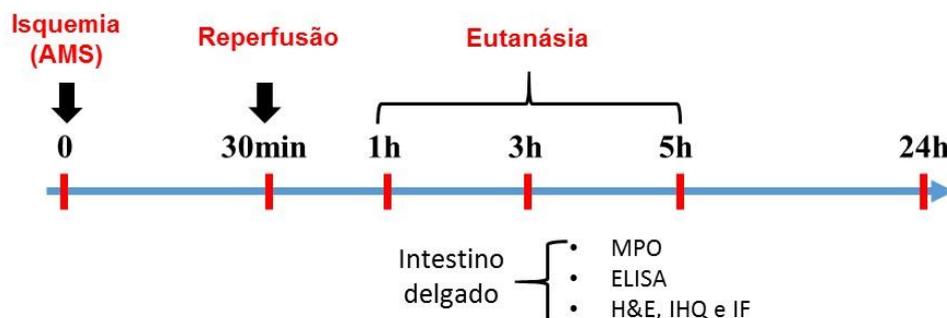
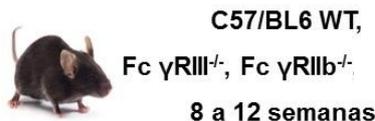


Figura 7 - Planejamento experimental de Indução da Isquemia e reperusão da artéria mesentérica superior em camundongos.

4.2 Microhematócrito para indicação de extravasamento plasmático

Após a eutanásia, foram utilizados tubos capilares heparinizados para coletar amostras de sangue dos animais. Os capilares foram centrifugados em uma centrífuga de micro-hematócrito por 10 minutos (Centrifuge hematocrit, HT). Após a centrifugação, com auxílio de uma régua, o hematócrito foi determinado através do cálculo do percentual da parte vermelha do sangue em relação ao total.

4.3 Coloração de H&E para avaliação histopatológica

Para a realização da análise histopatológica, um fragmento de amostra do intestino delgado foi removido e fixado em formol 10% tamponado pelo período de 48 horas. Após a fixação, o tecido foi desidratado gradualmente em etanol, embebido em parafina, cortado, fixado em lâminas histológicas e corados com H&E (Hematoxilina e Eosina). A análise histopatológica foi realizada após o exame das lâminas ao microscópio. A avaliação histopatológica foi baseada na intensidade de mononucleares e polimorfonucleares infiltrados na lâmina própria, nas mudanças na arquitetura da mucosa, na perda das vilosidades intestinais e na presença de edema, ulceração, hiperemia e hemorragia. Para cada parâmetro as alterações foram pontuadas de acordo com uma escala que pode variar entre (0) ausente a (4) muito intenso. A soma da pontuação representa o Escore histopatológico de 0

(normal) a 15 (muito alteradas). Os resultados foram expressos como valores médios \pm SEM para cada grupo experimental (adaptado de USSELMANN, 2001).

4.4 Avaliação da permeabilidade vascular

O extravasamento de Azul de Evans para o tecido foi usado como índice de aumento de permeabilidade vascular (SOUZA *et al.*,2007). Foi injetado 100 μ L de Azul de Evans (0,5% p/v em PBS) na veia caudal, 10 minutos antes da reperusão. Após a eutanásia dos animais, um fragmento do intestino foi coletado e colocado em uma placa de petri para secagem por 24 horas em estufa a 36°C. Após este tempo, o tecido foi pesado e incubado com 1mL de formamida, por 24 horas, para extração do corante. O corante extraído do tecido foi quantificado em leitor de ELISA (comprimento de onda de 620nm) e a concentração determinada através de curva padrão de 0.375 a 10 mg/mL de Azul de Evans. Após a quantificação, a concentração de azul de Evans foi normalizada para 100mg de tecido e os resultados expressos como concentração de Azul de Evans por 100mg de tecido.

4.5 Avaliação do acúmulo de neutrófilos pela quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no intestino foi utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase. Fragmentos de intestino foram pesados e suspensos em solução salina EDTA (100mg de tecido/1mL de salina), submetidos à homogeneização e centrifugação (3000g, 15 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em solução NaCl 0.2% p/v gelada e NaCl 1.6% p/v com glicose 5% p/v gelada na mesma quantidade. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em tampão fosfato com HTAB a 5% p/v e homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido seguidamente, centrifugadas e o sobrenadante coletado para ensaio de MPO. Amostras de intestino foram diluídas antes do ensaio. A atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450 nm) usando tetramethylbenzidine (1.6 mM) e H₂O₂ (0.5 mM). Os resultados foram expressos como unidades relativas (MPO) da O.D. do

sobrenadante do tecido comparadas com a O.D. obtida com neutrófilos do peritônio de camundongos processados da mesma maneira. Para este fim, foram coletados neutrófilos infiltrados para o peritônio após injeção de 3 mL de caseína 5% p/v. A curva padrão do número de neutrófilos (>95% de neutrófilos) versus O.D. foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados da maneira descrita para o ensaio de atividade de MPO.

4.6 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

A dosagem foi realizada a partir do sobrenadante de extratos de tecido. Para obtenção do extrato de tecido, amostras de tecido foram homogeneizadas numa solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM “phenylmethilsulfonyl fluoride”, 0,1 mM “benzethonium chloride”, 10 mM “EDTA” e 20 KI de aprotinina A) e “Tween 20” 0,05% v/v, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução, utilizando-se o homogeneizador Power Gen 125 (Fischer Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 10min a 4°C (em centrífuga BR4, Jouan Winchester VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) a -20°C, para posterior análise. Para realização do ensaio, as concentrações utilizadas para os anticorpos e reagentes e o protocolo de ensaio foi realizado conforme indicado pelo fabricante do kit (R&D Systems). Inicialmente, placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram recobertas com anticorpos purificados específicos para as moléculas em análise (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e CXCL-1), sendo 50 μ L/poço, em PBS, e incubadas por 18 horas a 4°C. Numa segunda etapa, as placas foram lavadas com PBS acrescido de Tween 20 0,1% v/v, e bloqueadas pela adição BSA 1% p/v em PBS (100 μ L/poço) por 2 horas, sob agitação. Após nova lavagem, amostras de sobrenadante de extrato de tecidos diluídas em BSA 1% p/v em PBS foram adicionadas em duplicata (50 μ L/poço) e, então, incubadas por 18 horas a 4°C. Após lavagem, foi adicionado anticorpo específico biotilado e, após incubação por 2 horas à temperatura ambiente e nova lavagem, foi utilizada uma solução de estreptoavidina acoplada à enzima peroxidase, seguido de incubação por 20 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. Após lavagem, a reação foi realizada pela adição de 50 μ L/poço do cromógeno OPD (Sigma) 4mg/10 mL,

contendo H₂O₂ (2μL/10 mL) em tampão citrato (pH 5,0) e a absorbância lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492nm (Status-labsystems, multiskan RC, Uniscience do Brasil). As amostras de intestino foram utilizadas para o ensaio após diluição na proporção de 1:3 de diluente (BSA 1% p/v em PBS).

4.7 Imuno-histoquímica para análise da deposição de IgG

A preparação inicial das secções foi realizada de acordo com o previamente descrito no item 4.3. Primeiramente, as lâminas histológicas foram desparafinizadas em xilol (3 vezes de xilol I - 30 minutos, xilol II - 10 minutos e xilol III- 5 minutos). Na sequência, os tecidos foram hidratados em soluções de etanol em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80%, 70% e 50%) e foi finalizada com banho em água deionizada por 5 minutos. O material seguiu para a recuperação antigênica em solução de tampão citrato 0,1 M (300 mL) no banho maria a 96° por 20 min. As lâminas permaneceram no tampão citrato por mais 20 minutos para resfriamento e, ao término, 5 banhos em água deionizada foram realizados. Procedeu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 10% v/v em metanol por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 minutos). Na continuação, realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 2% p/v e Tween 20 0,1% v/v por 1 hora em câmara úmida. Em seguida realizou-se o bloqueio dos receptores FcγR usando o anticorpo purificado rat anti-mouse CD16/CD32 (Fc Block; BD Pharmingen) na concentração de 0.5 mg/ml. Após o bloqueio, realizou-se a marcação do IgG depositado com o anticorpo Anti-mouse IgG Abs (Advance HRP; Dako). Foi então realizada uma lavagem rápida dos cortes com PBS puro com pisseta e lavagem em soluções de PBS (3 vezes de 5 minutos). Após a lavagem, seguiu-se com a amplificação do sinal utilizando a estreptavidina-biotina-peroxidase do kit Advanced (Dako) durante 1 hora em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS puro e passaram por lavagem em soluções de PBS (3 vezes de 5 minutos). Procedeu-se, então, com a revelação, ou seja, o material foi colocado em uma solução contendo o cromógeno DAB 0,025% v/v em PBS e H₂O₂. Essa etapa foi finalizada em água corrente por 5 minutos. Foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris (6 segundos), lavagem em água corrente por 5 minutos e hidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 2 vezes de 100% - as duas primeiras soluções por 5 minutos cada e, quando em etanol absoluto, 10

minutos para cada banho). O material seguiu para diafanização (2 vezes de xilol I - 15 minutos e xilol II - 10 minutos). Ao fim foi feita montagem das lâminas com Entellan. A determinação de células IgG+ presentes no tecido intestinal foi realizada pela contagem em 20 campos microscópicos usando o ImageJ software (National Institutes of Health). Os resultados foram expressos em números de células IgG+ por milímetros de tecido.

4.8 Quantificação de anticorpos circulantes.

Para a quantificação de anticorpos circulantes (IgG e IgM) foi utilizado a técnica de ELISA. Para isso, placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram recobertas com 100µL de anticorpo anti-Ig UNLB (na concentração de 1:5000) por, no mínimo, 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após esse tempo, as placas foram lavadas 2 vezes com salina-Tween. Em seguida, foi realizado o bloqueio com BSA (200µL de BSA 1%) por uma hora a temperatura ambiente seguido de 2 lavagens. Em seguida, as amostras (soro) foram diluídas nas proporções 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000 para dosar IgG e nas proporções de 1:1000, 1:2000 e 1:4000 para as dosagens de IgM e incubado 50 µL de cada amostra por 1 hora. Após esse tempo, foi realizado a incubação com o anticorpo goat anti-mouse IgG biotinilado ou goat anti-mouse IgM biotinilado (diluição 1:5000), sendo 100 µL por poço, por 1 hora, após a lavagem foi feita a incubação com estreptavidina acoplada à enzima peroxidase. Para isso, foi adicionado 100 µL de estreptavidina na diluição (1:200) por 30 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem da placa e foi feito a revelação, pela adição de 50µL/poço do cromógeno OPD (Sigma) 4mg/10 mL, contendo H₂O₂ (2µL/10 mL) em tampão citrato (pH 5,0) e a absorbância lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492nm (Status-labsystems, multiskan RC, niscience do Brasil).

4.9 Isolamento de enterócitos

Para o isolamento dos enterócitos, o intestino delgado foi aberto longitudinalmente, cortado em pedaços de aproximadamente 4-5 cm de comprimento e transferidos para tubos de plástico. Em seguida, lavou-se rapidamente em 50 mL de tampão A

(HBSS contendo 1% de soro fetal bovino) com agitação suave durante 10 min. Esse processo foi repetido cinco vezes, seguido por uma lavagem em 50 ml de tampão HBSS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Após este passo foi realizado a lavagem com o tampão contendo 1mM de DTT para a retirada de muco. Foi realizado então mais uma lavagem com o tampão HBSS. Em seguida os pedaços intestinais foram incubados em 25 ml de tampão HBSS contendo 30 mM de EDTA a 37 ° C durante 30 min com agitação a 30g. As células foram então coletadas e sedimentadas por centrifugação a 500g durante 5 min e ressuspensas em 10 ml de meio RPMI. Em seguida as células foram novamente centrifugadas a 500g por 5 minutos e ressuspensas em 1mL de solução de lise (Tris 10mM, PH 7,4, NaCl 10mM, MgCl_2 3mM, NaN_3 0,002% p/v, PMSF 1mM, EGTA 0,1mM, Aprotinina 10 μ M, Leupeptina 20 μ M, DTT 0,5mM, NaF 25mM) e mantidas no gelo por 20min para extração de proteínas. Após esse passo foi realizada mais uma centrifugação a 3000g por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado.

4.10 Quantificação de anticorpos anti-antígenos intestinais.

Para a quantificação de anticorpos anti-antígenos intestinais, primeiramente foi realizado a dosagem de proteínas nos extratos de enterócitos isolados no item 4.9. pelo método de Bradford. Após a quantificação, 100 μ L de uma solução de 10 μ g/mL do antígeno foi adicionada a placa de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) por 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após esse passo, o ensaio foi realizado como o descrito para a quantificação de anticorpos circulantes, modificando apenas a diluição do soro, que foi de 1:100.

4.11 Quantificação de anticorpos anti-microbiota fecal

Para a quantificação de anticorpos anti-microbiota, primeiramente um *pool* de fezes de camundongos WT e $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ foram coletadas. Para a extração de antígenos da microbiota fecal, primeiramente as fezes foram homogeneizadas e lavadas com PBS 1X e centrifugadas 5 minutos na velocidade de 1500g. Após as lavagens, os *pellets* foram ressuspensos em 1mL de solução de lise (Tris 10mM, PH 7,4, NaCl 10mM, MgCl_2 3mM, NaN_3 0,002% p/v, PMSF 1mM, EGTA 0,1mM, Aprotinina 10 μ M,

Leupeptina 20 μ M, DTT 0,5mM, NaF 25mM). Após este processo, usando o sonicador (MSE Soniprep), a suspensão foi sonicada por 3 ciclos de 30 segundos em intensidade alta com intervalos de 60 segundos entre os ciclos. Em seguida, as amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos e após esse tempo foram centrifugadas a 4000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e as proteínas quantificadas pelo método de Bradford. Após a quantificação, 100 μ L de uma solução de 10 μ g/mL do antígeno foi adicionada a placa de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) por 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após esse passo, o ensaio foi realizado como o descrito para a quantificação de anticorpos circulantes, modificando apenas a diluição do soro que foi de 1:100.

4.12 Depleção da microbiota com coquetel de antibióticos

Para a depleção da microbiota, camundongos WT e Fc γ RIIB^{-/-} com 6 semanas de vida receberam, por 21 dias, uma combinação de antibióticos de amplo espectro. Os camundongos foram mantidos em microisoladores (máximo de 3 animais por isolador) durante todo o protocolo experimental. A água dos animais foi suplementada com ampicilina 1g/L. Duas vezes por dia, um coquetel de antibióticos consistindo de vancomicina (50 mg / kg), neomicina (100 mg / kg), metronidazol (100 mg / kg) e nistatina (0,03 mg / camundongo) foi administrado por gavagem (100 μ l por dose) durante 21 dias. Esses animais também receberam ciprofloxacino (0,2mg/100 μ L) por injeção intraperitoneal uma vez por dia. A maravalha e os microisoladores foram trocados periodicamente e todo o experimento conduzido em condições de assepsia para prevenir a reinfecção dos camundongos. Para verificar se o tratamento com antibiótico foi eficaz na depleção da microbiota, amostras de fezes foram cultivadas em meio tioglicolato (24h/37°C) em diferentes tempos pós início do tratamento. O sangue dos camundongos foi coletado pela cauda nos seguintes tempos: antes do início do tratamento e com 7, 14 e 21 dias de tratamento para a dosagem de IgG.

4.13 Quantificação de hemoglobina

A determinação da concentração de hemoglobina no tecido foi utilizada como índice de hemorragia tecidual. Para isso, primeiramente, o intestino foi lavado com tampão PBS para a remoção de sangue no espaço intravascular. Após a lavagem, aproximadamente 100mg do duodeno foi removido e homogeneizada com o reagente de cor de Drabkin de acordo com as instruções do fabricante (Analisa, Belo Horizonte, Brasil). Em seguida, a suspensão foi centrifugada durante 15 minutos a 3000g a 4°C e filtrada utilizando filtro de seringa de 0,2 µm. Após a filtração, 100µL da solução final foi adicionada em uma placa de 96 poços e a absorbância foi lida a 520nm usando um leitor de placas de ELISA. Para a determinação da concentração de hemoglobina a absorbância foi então comparada com uma curva padrão de hemoglobina.

4.14 Avaliação da translocação bacteriana

Após a realização da IRI, o pulmão e os linfonodos mesentéricos foram coletados para a avaliação da translocação bacteriana. Após a coleta, os tecidos foram pesados, diluídos na concentração de 10^{-1} em solução salina e plaqueados no meio de cultura ágar Mueller-Hinton. O lavado peritoneal foi realizado utilizando 1 mL de solução salina e depois plaqueado em meio de cultura ágar Mueller-Hinton. As placas foram encubadas por 24h a 37° em aerobiose.

4.15 Análise estatística

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Os resultados foram apresentados como média±erro padrão médio. O nível de significância adotado foi de $P<0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 A lesão de reperfusão induz deposição de IgG no tecido intestinal

Inicialmente, avaliamos a deposição de IgG no tecido intestinal pelo método de imuno-histoquímica. Nossos resultados demonstram que animais sham apresentaram, em média, $32,12 \pm 17,07$ células marcadas por IgG (Figura 1B). Em contrapartida, os cortes histológicos dos animais submetidos a 30 minutos de isquemia e 3 horas de reperfusão apresentaram em média $104,08 \pm 20,9$ células marcadas por IgG, sugerindo uma maior deposição de IgG nos tecidos de animais submetidos a IRI. Vale ressaltar que, além da presença de um maior número de células IgG-positivas, animais submetidos a IRI apresentaram intensa marcação para IgG em áreas compreendendo o lúmen intestinal, sugerindo que há translocação de IgG para o lúmen durante IRI. Em conclusão, há deposição de IgG 3 horas após a indução da IRI em camundongos.

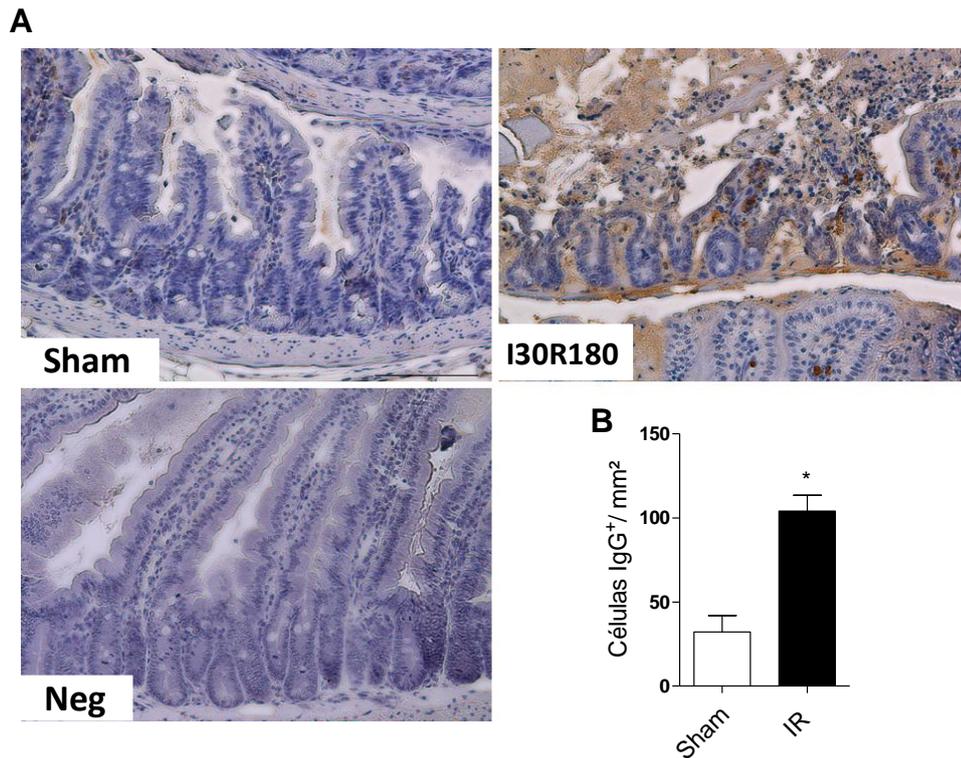


Figura 8- Camundongos WT apresentam maior deposição de IgG no tecido intestinal após 30 minutos de isquemia e 3h de reperfusão: Camundongos WT foram submetidos ao protocolo de I3OR180 e o intestino coletado para análise da deposição de IgG por imunohistoquímica (A) e realização da contagem de células IgG⁺ (B). Na primeira linha da prancha histológica no lado esquerdo está representado animais Sham e no lado direito camundongos submetidos a IRI. Na segunda linha temos representado o controle negativo da reação de IHQ. As imagens da prancha histológica são representativas de um experimento contendo 4 camundongos em cada grupo. A barra, na prancha histológica, representa 100µm. Em B, as barras representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs Sham ou #P<0,05 vs WT IR.

5.2 O receptor FcγRIII exerce importante papel pró-inflamatório no modelo de isquemia e reperfusão intestinal.

5.2.1 Animais FcγRIII^{-/-} apresentam maior sobrevivência associada a menor lesão intestinal após IRI.

A isquemia e reperfusão intestinal é acompanhada de uma alta taxa de letalidade. Na figura 9, podemos observar que após a IRI, camundongos WT apresentaram 80% de letalidade até 24h após a reperfusão. No entanto, de forma interessante, a alta taxa de letalidade induzida pela IRI foi revertida nos animais com deleção genética para o receptor FcγRIII, uma vez que estes animais apresentaram apenas 20% de taxa de letalidade no mesmo período de tempo. Vale ressaltar que não

houve diferenças entre os animais sham dos grupos WT e $Fc\gamma RIII^{-/-}$, já que 100% dos animais de ambos os grupos sobreviveram durante todo o período avaliado. Decidimos realizar a eutanásia para coleta de tecidos nos próximos experimentos após 5 horas de reperfusão, uma vez que após esse período de reperfusão, 58% dos animais selvagens já estão mortos.

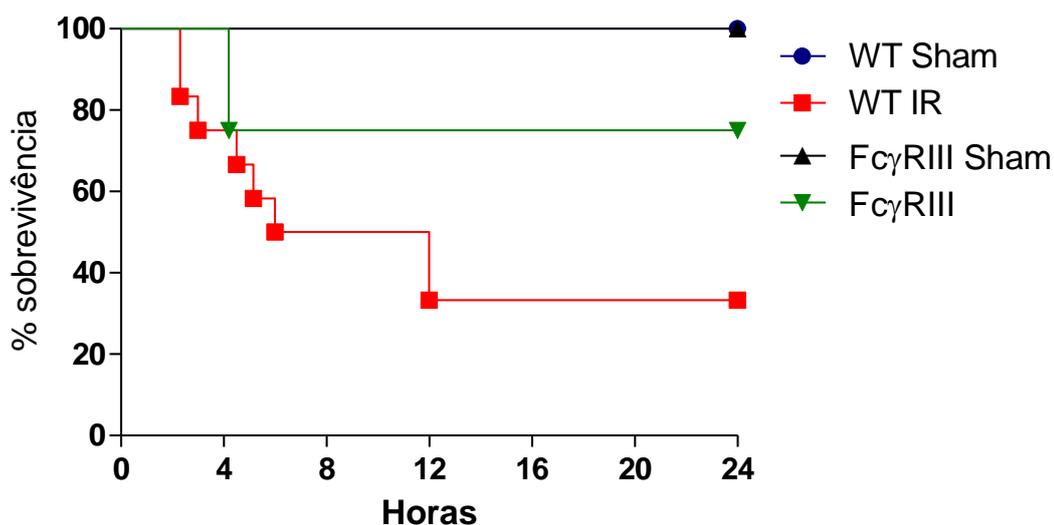


Figura 9- Camundongos $Fc\gamma RIII^{-/-}$ apresentaram redução na taxa de mortalidade induzida por IRI: Camundongos WT e $Fc\gamma RIII^{-/-}$ foram submetidos a 30 minutos de isquemia e, após a realização da reperfusão, a mortalidade desses animais foi acompanhada por 24h. N= 5 a 7.

Consoante com a alta taxa de letalidade, camundongos WT apresentaram uma intensa lesão intestinal após IRI. Após 5h de reperfusão, podemos observar a destruição completa do epitélio intestinal, com perda das vilosidade e áreas apresentando erosão e ulceração. Além disso, foram observadas áreas com hemorragia, edema e intenso infiltrado inflamatório (Figura 10A), resultando em uma alta pontuação histopatológica (Figura 10B). Por outro lado, nos camundongos $Fc\gamma RIII^{-/-}$ podemos observar uma atenuação da lesão intestinal induzida pela IRI. Através da análise histopatológica destes animais, podemos observar a preservação da arquitetura intestinal, sem áreas de erosão e ulceração e redução do infiltrado inflamatório (Figura 10A), não havendo assim diferença significativa na pontuação histopatológica entre o grupo de animais que foi submetido a IRI e o grupo sham (Figura 10B). Ainda, camundongos $Fc\gamma RIII^{-/-}$ também apresentaram menor pontuação histopatológica quando comparados a camundongos WT que também foram submetidos a IRI (Figura 10B). Vale ressaltar que não há diferenças entre os animais WT sham e $Fc\gamma RIII^{-/-}$ sham.

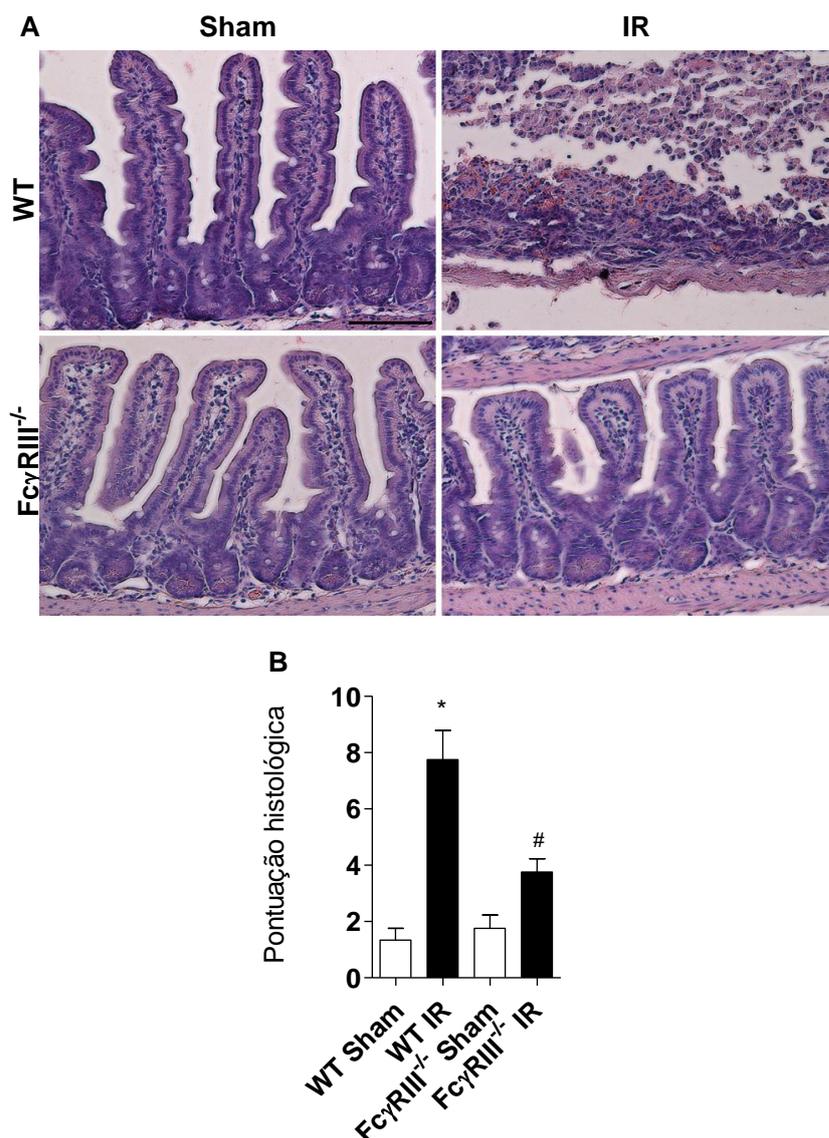


Figura 10- Camundongos Fc γ RIII^{-/-} apresentam menor lesão tecidual após isquemia e reperfusão intestinal: Camundongos WT e Fc γ RIII^{-/-} foram submetidos ao protocolo de I30R300 e o intestino coletado para análise histológica por H&E (A) e realização da pontuação histopatológica (B). Na primeira coluna da prancha histológica está representado animais Sham e na segunda coluna animais que foram submetidos a IRI. As imagens da prancha histológica são representativas de 5 camundongos em cada grupo experimental. A barra, na prancha histológica, representa 100 μ m. Em B, as barras representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs Sham ou #P<0,05 vs WT IR.

5.2.2 A ausência do receptor Fc γ RIII diminui o aumento de permeabilidade vascular no intestino após IRI

Corroborando com a intensa lesão intestinal após IRI, camundongos WT apresentaram um aumento na permeabilidade vascular, caracterizado por maior extravasamento plasmático (Figura 11A) e hemoconcentração (Figura 11B),

conforme avaliado pela quantificação de azul de Evans e medida de hematócrito, respectivamente. Por outro lado, $Fc\gamma RIII^{-/-}$ apresentaram uma atenuação destes parâmetros.

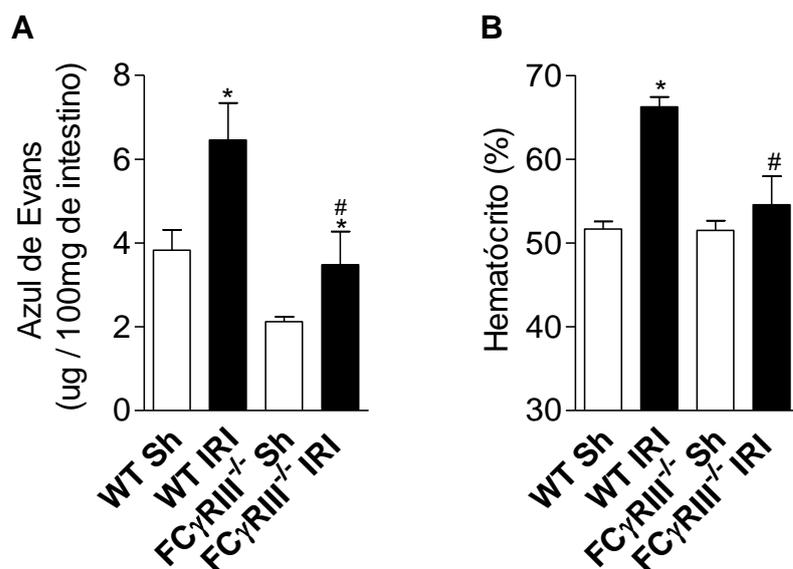


Figura 11- A ausência do receptor $Fc\gamma RIII$ resulta em menor extravasamento plasmático após IRI: Camundongos WT e $Fc\gamma RIII^{-/-}$ foram submetidos ao protocolo de I30R300 e o intestino coletado para análise do extravasamento plasmático pelo método de Azul de Evans (A) e o sangue foi coletado para análise de hematócrito (B). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão * $P < 0,05$ vs Sham ou # $P < 0,05$ vs WT IR. N= 4 a 12.

5.2.3 A ausência do receptor $Fc\gamma RIII$ diminui o influxo de neutrófilos e a liberação de mediadores inflamatórios após IRI.

O influxo de neutrófilos é um dos primeiros eventos inflamatórios desencadeados durante a isquemia e reperfusão intestinal. Aqui, demonstramos que após 5h de reperfusão do leito vascular intestinal ocorreu um intenso influxo de neutrófilos para o intestino dos camundongos WT (Figura 12A). Este maior influxo de neutrófilos foi associado ao aumento na concentração da quimiocina CXCL-1 (Figura 12B) no intestino destes camundongos. Em adição, a IRI levou a um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Figura 12C), IL-1 β (Figura 12D) e IL-6 (Figura 12E). Além disso, houve um aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-

10 (Figura 12F). Por outro lado, os animais deficientes para o receptor FcγRIII não apresentaram aumento no recrutamento de neutrófilos para o tecido intestinal (Figura 12A). Além disso, a ausência desse receptor resultou em menor produção da quimiona CXCL-1 (Figura 12B) e das citocinas TNF-α (Figura 12C), IL-6 (Figura 12E), IL-1β (Figura 12D) e IL-10 (Figura 12F) no intestino.

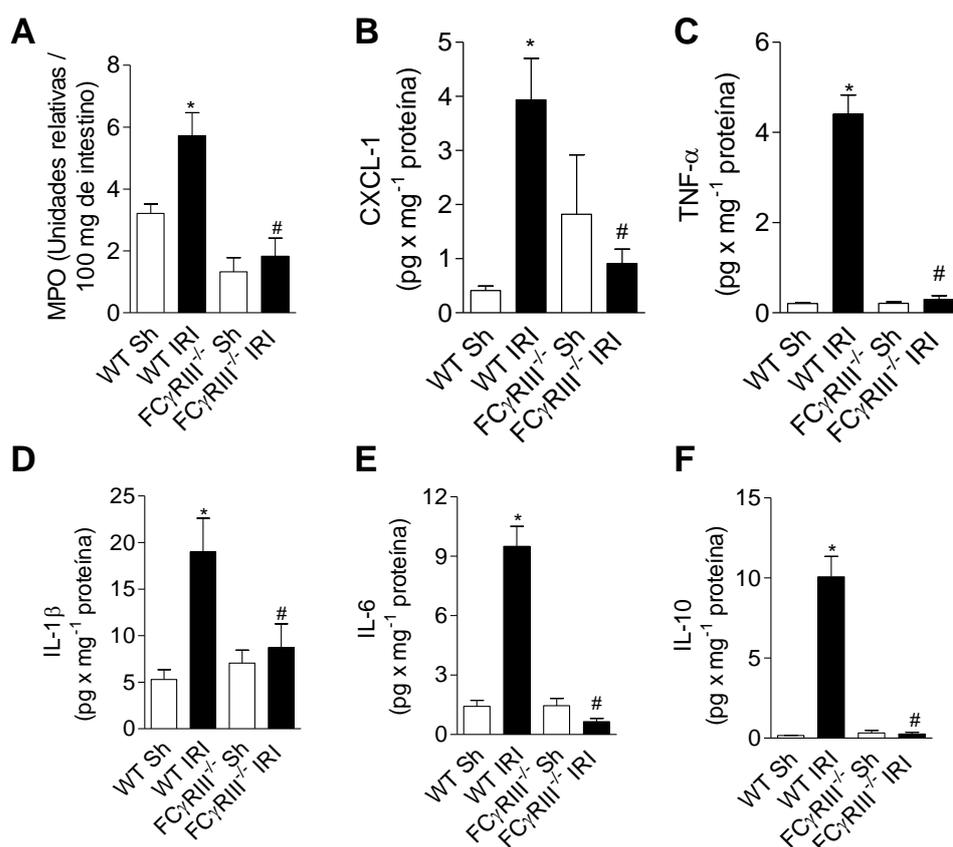


Figura 12- Animais FcγRIII^{-/-} apresentaram menor produção de mediadores inflamatórios no tecido intestinal: Camundongos WT e FcγRIII^{-/-} foram submetidos ao protocolo de I30R300 e o intestino coletado para análise do influxo de neutrófilos (A), produção da quimiona CXCL-1 (B) e das citocinas TNF-α (C), IL-1β(D), IL-6 (E) e IL-10 (F). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão *P<0,05 vs Sham ou #P<0,05 vs WT IR. N= 5 a 7.

5.3 O receptor Fc γ RIIB é importante para o controle da lesão tecidual induzida pela isquemia e reperfusão intestinal

5.3.1 Camundongos deficientes para o receptor Fc γ RIIB^{-/-} apresentam maior letalidade e lesão tecidual após IRI

Como descrito anteriormente, camundongos WT apresentam elevada taxa de mortalidade após IRI. De forma interessante, camundongos Fc γ RIIB^{-/-} apresentaram maior taxa de letalidade quando comparado a animais WT. Após 4h de reperfusão, enquanto a taxa de mortalidade de animais WT era de 40%, 75% dos animais Fc γ RIIB^{-/-} já havia sucumbido. Além disso, animais Fc γ RIIB^{-/-} apresentaram 100% de letalidade até 12h após a reperfusão. Devido à morte precoce desses animais, o momento de eutanásia dos camundongos para os próximos experimentos foi determinado como 3h após a reperfusão.

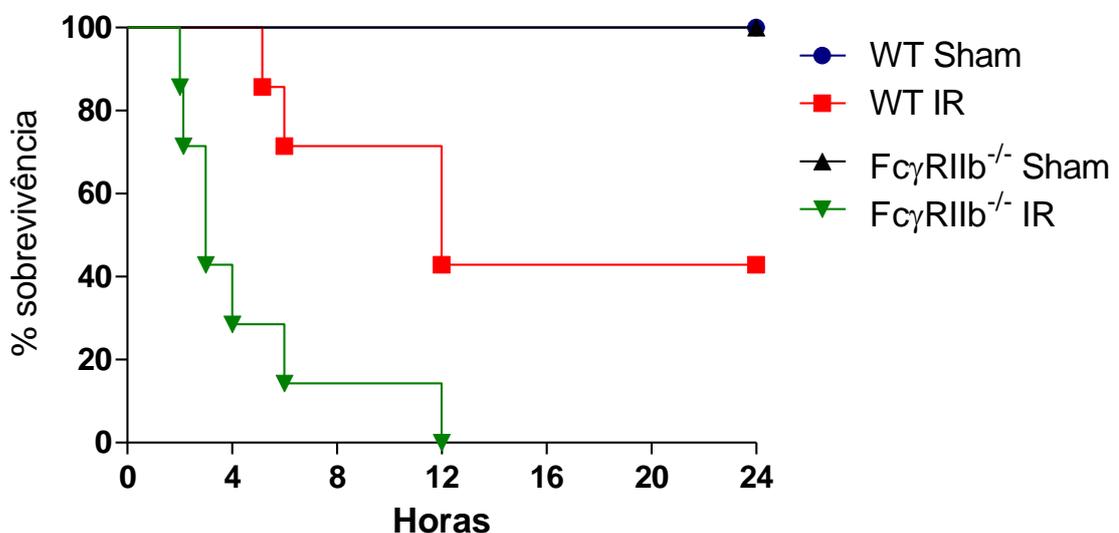


Figura 13- Animais Fc γ RIIB^{-/-} apresentam maior mortalidade do que animais WT: Camundongos WT e Fc γ RIIB^{-/-} foram submetidos a 30 minutos de isquemia e, após a realização da reperfusão, a mortalidade desses animais foi acompanhada por 24h. N= 3 a 7.

A maior letalidade dos animais Fc γ RIIB^{-/-} foi acompanhada de uma maior lesão tecidual quando comparado a animais WT (Figura 14A). Após 3h de reperfusão, animais WT apresentaram intensa lesão tecidual o que resultou em uma alta pontuação histopatológica (Figura 14B). No entanto, animais deficientes para o

receptor FcγRIIb apresentaram uma exarcebação dos parâmetros avaliados (Figura 14B). Corroborando com este dado, camundongos FcγRIIb^{-/-} também apresentaram maiores concentrações de hemoglobina no tecido intestinal após IRI, indicando uma intensa hemorragia após IRI (Figura 14C).

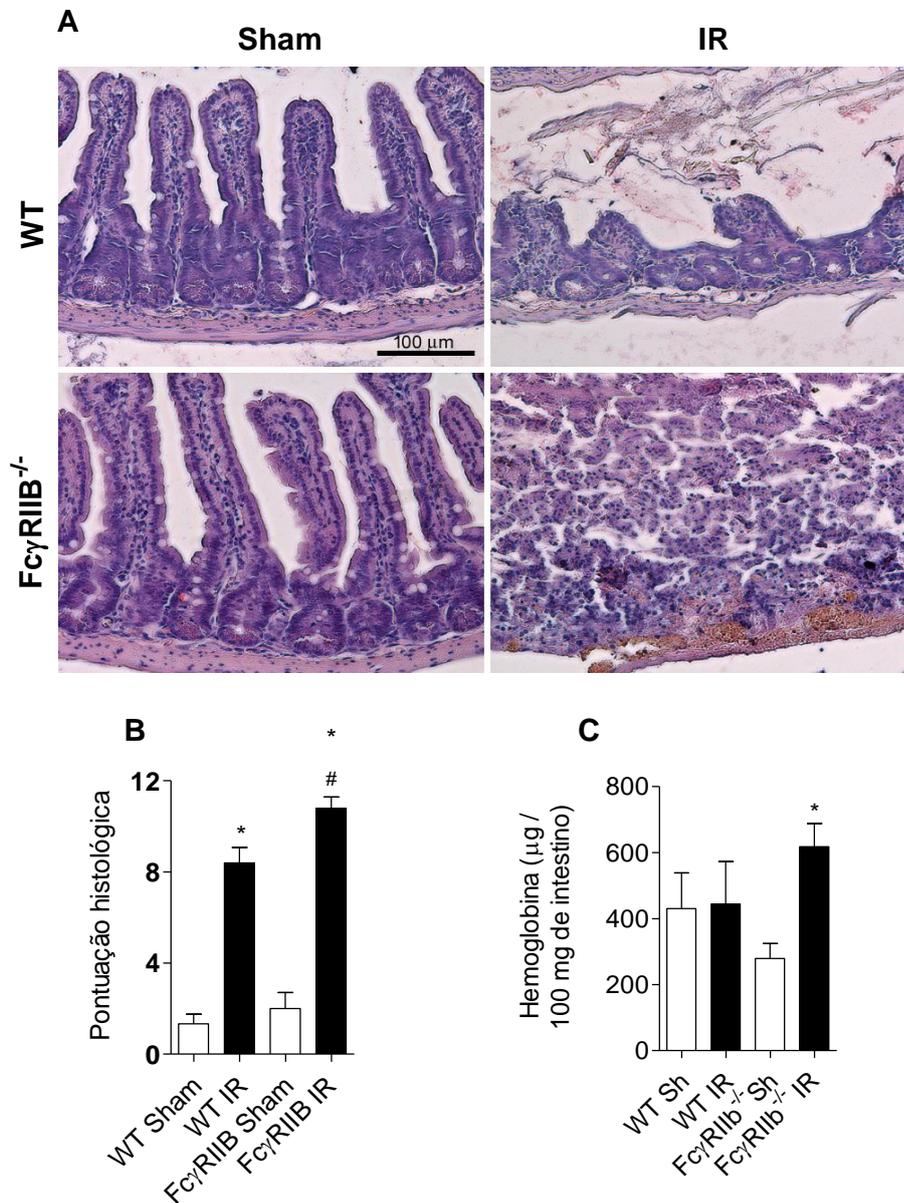


Figura 14- Camundongos FcγRIIb^{-/-} apresentam exarcebação da lesão tecidual induzida pela IRI: Camundongos WT e FcγRIIb^{-/-} foram submetidos ao protocolo de I30R180 e o intestino coletado para análise histológica por H&E (A), realização da pontuação histopatológica (B) e dosagem de hemoglobina (C). Na primeira coluna da prancha histológica está representado animais Sham e, na segunda coluna, animais que foram submetidos a IRI. As imagens da prancha histológica são representativas de um experimento contendo 5 camundongos em cada um dos grupos. A barra, na prancha histológica, representa 100µm. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão *P<0,05 vs Sham ou #P<0,05 vs WT IR. N= 5 a 7.

Uma das funções da barreira intestinal é impedir a translocação de microrganismos da microbiota intestinal para outros sítios, o que pode resultar em um quadro grave para o hospedeiro. Nos animais $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ foi possível observar que a intensa lesão do tecido intestinal foi acompanhada da translocação de bactérias da microbiota comensal para o pulmão (Figura 15A), peritônio (Figura 15B) e linfonodos mesentéricos (Figura 15C).

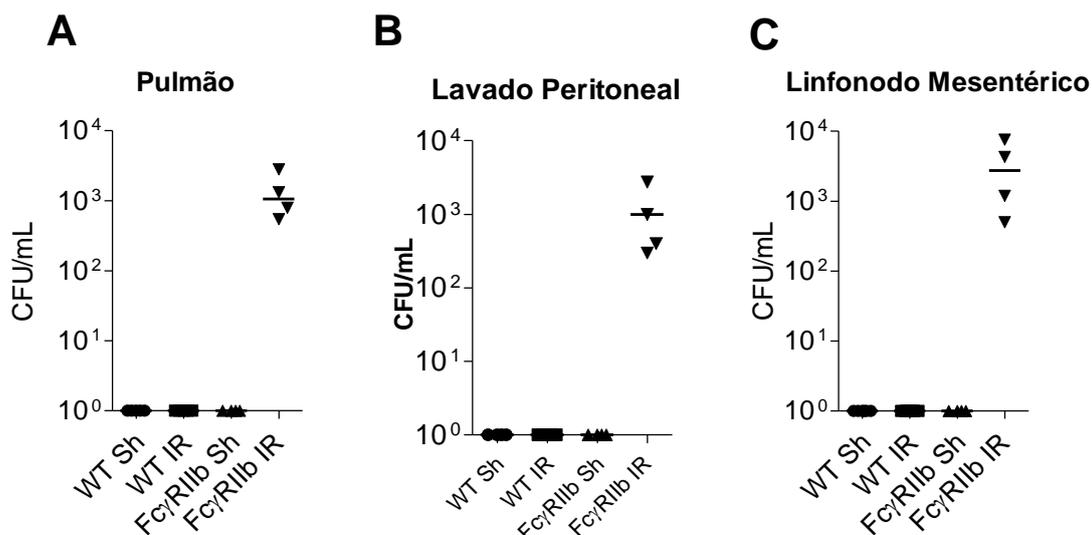


Figura 15- A ausência do receptor $Fc\gamma RIIb$ resultou em translocação bacteriana para outros órgãos após IRI: Camundongos WT e $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ foram submetidos ao protocolo de I30R180 e o pulmão (A), lavado peritoneal (B) e linfonodo mesentérico (C) retirados para avaliação da translocação bacteriana por plaqueamento em ágar Mueller-Hinton. N= 5 a 7.

5.3.3 Camundongos deficientes para o receptor $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ não apresentam maior recrutamento neutrófilo e aumento na produção de mediadores inflamatórios após IRI quando comparado a animais WT.

Após 3h de reperusão, animais WT apresentaram aumento no recrutamento de neutrófilos (Figura 16A), o que também foi observado nos animais $Fc\gamma RIIb^{-/-}$. O aumento no influxo de neutrófilos para o tecido intestinal dos animais WT e $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ foi acompanhado do aumento da produção da citocina pró-inflamatória IL-6 (Figura 16C). Apesar dos animais $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ não apresentarem aumento no recrutamento de neutrófilos em relação aos animais WT que também foram submetidos a IRI, esses animais apresentaram aumento na concentração da quimiocina CXCL-1 (Figura 16B). A reperusão do leito isquêmico nos animais WT foi também acompanhada do

aumento da produção da citocina IL-1 β , no entanto o mesmo não foi observado nos animais Fc γ RIIb $^{-/-}$ (Figura 16D).

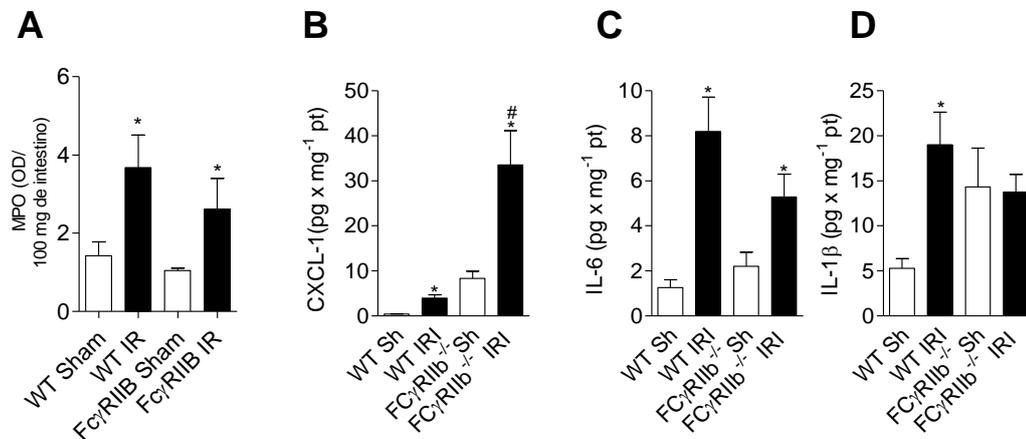


Figura 16- A deleção do receptor Fc γ RIIb não altera a resposta inflamatória frente a IRI: Camundongos WT e Fc γ RIIb $^{-/-}$ foram submetidos ao protocolo de IRI nos tempos de I30R180 e o intestino coletado para análise do influxo de neutrófilos (A) e da produção de mediadores inflamatórios CXCL-1 (B) e das citocinas IL-6 (C) e IL-1 β (D). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão *P<0,05 vs Sham ou #P<0,05 vs WT IR. N= 5 a 7.

5.3.4 Animais Fc γ RIIb $^{-/-}$ apresentam resposta de reperfusão precoce independente do recrutamento de neutrófilos

Para avaliar o papel do receptor Fc γ RIIb $^{-/-}$ na indução do recrutamento de neutrófilos frente a IRI, adiantamos a eutanásia para 1h após a reperfusão. Neste tempo de reperfusão, animais WT ainda não apresentam aumento da atividade de MPO (Figura 17D). Consoante com a nossa hipótese, podemos observar que com 1 hora de reperfusão há lesão tecidual nos animais selvagens, mas esta é maior em animais Fc γ RIIb $^{-/-}$ (Figura 17A) o que resultou em maior pontuação histopatológica (Figura 17B). Além disso, embora animais selvagens apresentem concentrações de hemoglobina (Figura 17C) semelhantes às concentrações dos animais sham após 1 hora de reperfusão, animais Fc γ RIIb $^{-/-}$ apresentam uma elevação desse parâmetro, indicando maior hemorragia no tecido intestinal. Embora tenha maior lesão tecidual, a atividade de MPO em animais Fc γ RIIb $^{-/-}$ submetidos a IRI foi semelhante a de animais sham e a de animais WT submetidos a IRI, sugerindo que a maior lesão tecidual não é secundária a um maior influxo de neutrófilos para o intestino dos animais Fc γ RIIb $^{-/-}$.

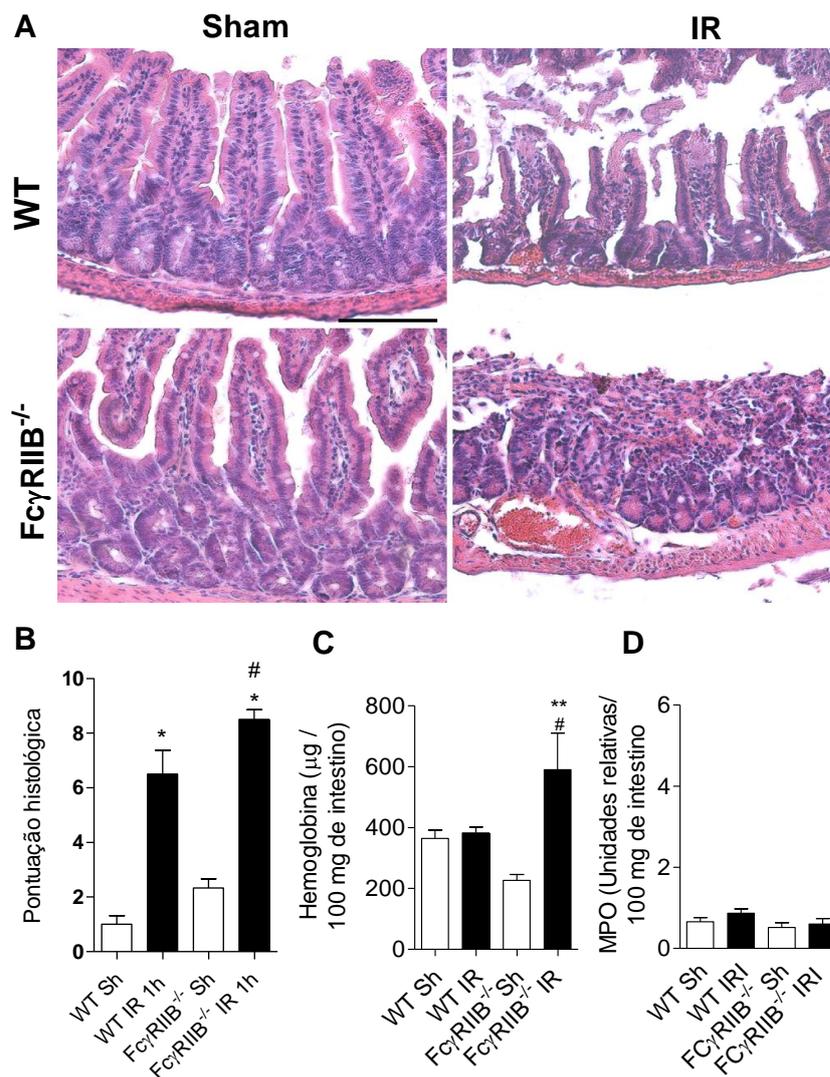


Figura 17- camundongos FcγRIIb^{-/-} apresentaram maior lesão tecidual independente do recrutamento de neutrófilos após 1h de reperusão: Camundongos WT e FcγRIIb^{-/-} foram submetidos ao protocolo de I30R60 e o intestino coletado para análise histológica por H&E (A), realização da pontuação histopatológica (B), dosagem de hemoglobina (C), e análise do influxo de neutrófilos (D). Na primeira coluna da prancha histológica está representado animais Sham e, na segunda coluna, animais que foram submetidos a IRI. As imagens da prancha histológica são representativas de um experimento contendo 4 camundongos em cada grupo. A barra, na prancha histológica, representa 100µm. Em B, C e D as barras representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs Sham ou #P<0,05 vs WT IR. N= 5 a 7.

5.3.5 Animais FcγRIIb^{-/-} apresentam maior deposição de IgG no tecido intestinal após 1h de reperusão.

A partir dos resultados anteriores foi possível observar que a maior lesão tecidual apresentada por camundongos FcγRIIb^{-/-} é independente do recrutamento de neutrófilos. Dessa forma, nosso próximo passo foi buscar entender o mecanismo

pele qual estes animais apresentavam maior lesão tecidual. De maneira interessante, através da técnica de imuno-histoquímica, pudemos perceber que camundongos $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ apresentavam intenso aumento do número de células IgG-positivas no tecido intestinal após 1h de reperfusão, fato não observado em animais WT, sugerindo maior deposição de IgG no tecido intestinal em animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ (Figura 18A e 18B).

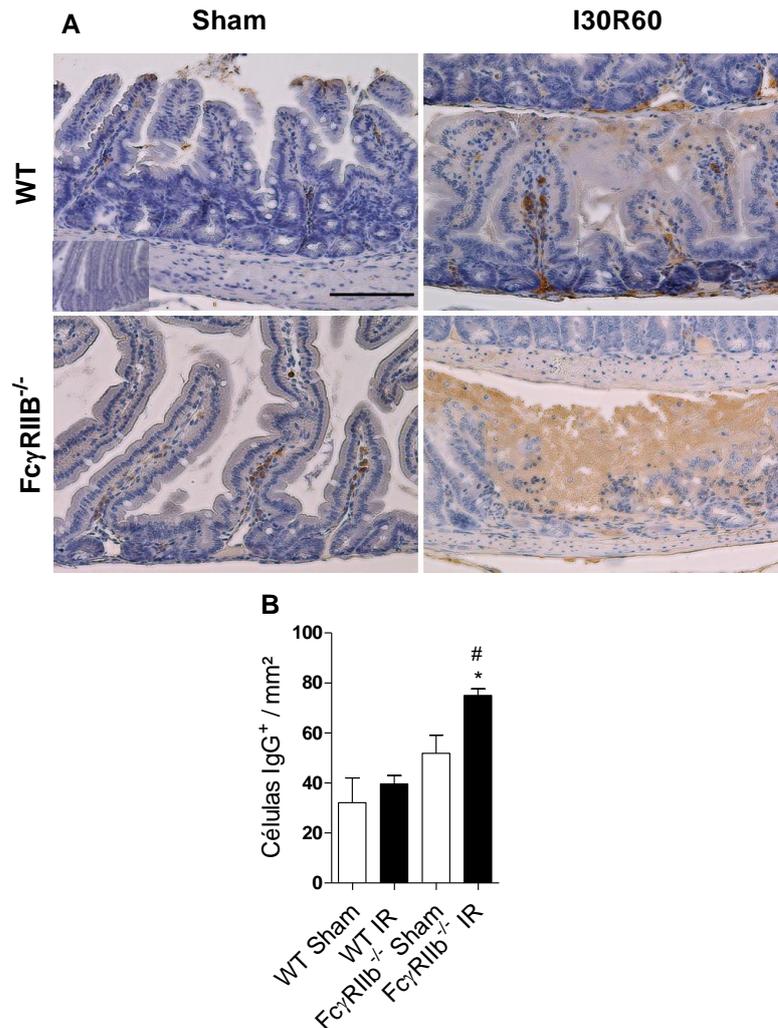


Figura 18- camundongos $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ apresentam maior deposição de IgG no tecido intestinal após 1h de reperfusão: Camundongos WT e $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ foram submetidos ao protocolo de I30R180 e o intestino coletado para análise da deposição de IgG por imunohistoquímica (A) e realização da contagem de células IgG⁺ (B). Na primeira coluna da prancha histológica está representado camundongos Sham e, na segunda coluna, camundongos que foram submetidos a IRI. As imagens da prancha histológica são representativas de um experimento contendo 4 camundongos em cada grupo. A barra, na prancha histológica, representa 100 μ m. Em B, as barras representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs Sham ou #P<0,05 vs WT IR.

5.3.6 O receptor Fc γ RIIB regula o repertório de IgG exercendo assim importante papel na lesão induzida por IRI.

O receptor Fc γ RIIB é um receptor que conhecidamente participa da regulação negativa da produção de imunoglobulinas e auto anticorpos por linfócitos B (ABBAS *et al.*, 2015). Diante disso, avaliamos se a ausência do receptor Fc γ RIIB poderia induzir um descontrole da produção de anticorpos relevantes para a lesão de IRI. De forma interessante, avaliando o perfil de anticorpos ao longo da vida de animais Fc γ RIIB^{-/-} observamos que camundongos Fc γ RIIB^{-/-} apresentam maior concentração de IgG circulante na quinta e sétima semana de vida quando comparados a animais WT (Figura 19A). Por outro lado, esses camundongos apresentaram maiores níveis da concentração de IgM circulante apenas na quinta semana de vida quando comparado a camundongos WT (Figura 19B). Além da alteração da concentração de anticorpos totais, camundongos deficientes para o receptor Fc γ RIIB também apresentaram maior concentração de IgG reativos a microbiota fecal na quinta e na oitava semana de vida (Figura 19C). E, de forma semelhante, esses animais também apresentam aumento na concentração de IgG reativos a antígenos intestinais nos mesmos tempos quando comparado a animais selvagens (Figura 19D).

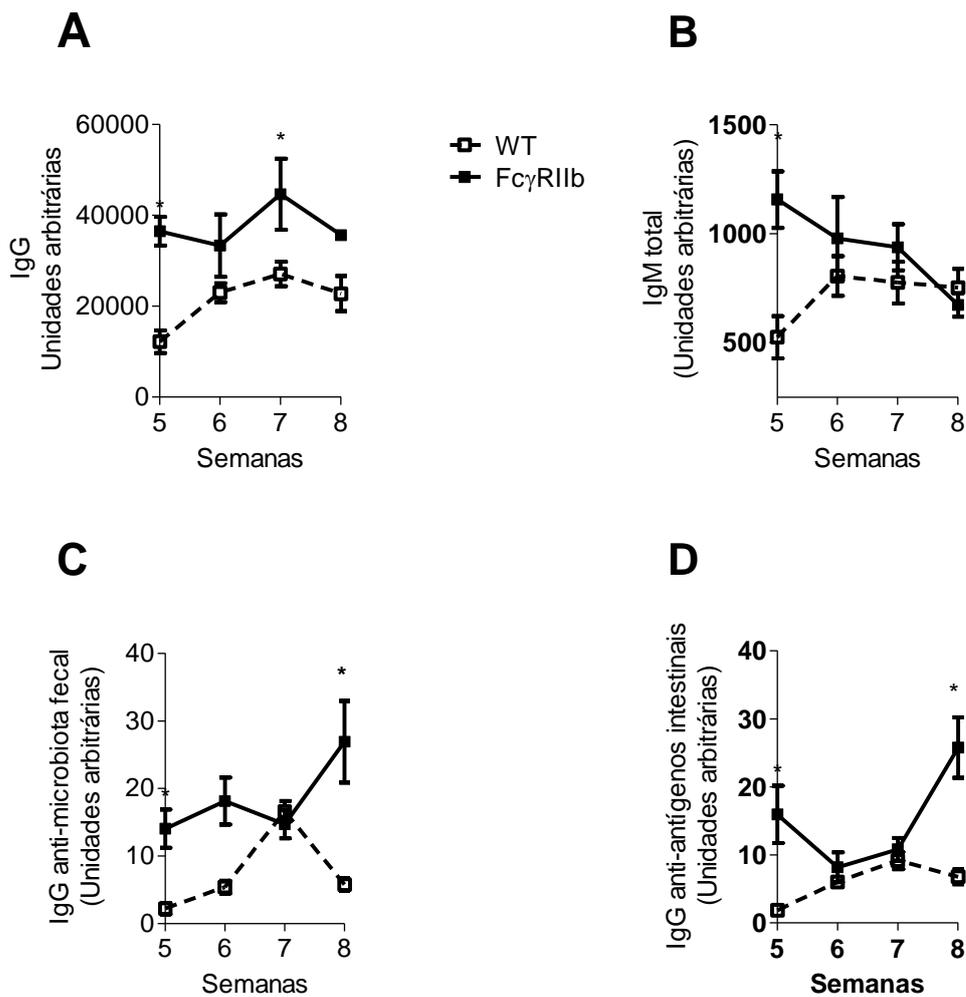


Figura 19- Camundongos FcγRIIB^{-/-} apresentam alteração no repertório de anticorpos: Camundongos WT e FcγRIIB^{-/-} foram acompanhados do período de 5 semanas de vida até 8 semanas de vida e o soro coletado para análise da concentração de IgG total (A), IgM total (B), IgG anti-microbiota fecal (C) e IgG anti-antígenos intestinais (D) pelo método de ELISA. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão *P<0,05 vs WT. N= 5 a 7.

Para correlacionar a maior susceptibilidade dos animais FcγRIIB^{-/-} com os altos níveis de IgG reativos a antígenos intestinais por eles produzido, foi realizado um experimento de mortalidade com animais FcγRIIb^{-/-} na sétima semana de vida, onde encontramos menores níveis de IgG anti-antígenos intestinais. Dessa forma, podemos perceber que os animais FcγRIIb^{-/-} com 7 semanas de vida apresentaram atraso na taxa de mortalidade quando comparados com animais FcγRIIb^{-/-} com 8 semanas de vida, o que não foi observado em animais WT (Figura 20). É válido ressaltar que também não foi encontrado diferença estatística na letalidade entre animais FcγRIIb^{-/-} com 7 semanas e animais WT com 8 semanas de vida. Estes

resultados sugerem que altas concentrações de IgG reativo a antígenos intestinais implicam em maior mortalidade induzida pela IRI.

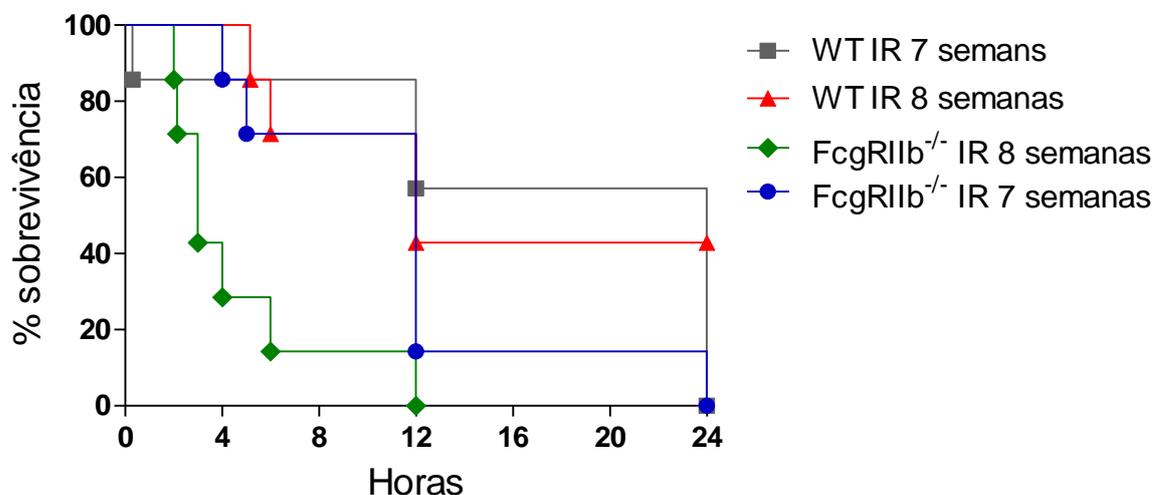


Figura 20- Animais FcγRIIb^{-/-} com 7 semanas de idade apresentam atraso na mortalidade após IRI: Após IRI, animais FcγRIIb^{-/-} com 7 semanas de idade e menor nível de auto-anticorpos apresentaram atraso na mortalidade quando comparado com animais FcγRIIb^{-/-} com 8 semanas de idade. Nenhuma diferença foi observada entre animais WT com as diferentes idades. N= 5 a 7.

5.3.7 A microbiota intestinal está envolvida na produção acentuada de auto-anticorpos em animais FcγRIIB

Uma vez que os níveis de anticorpos anti-antígenos intestinais e anti-microbiota fecal aumentaram em tempos semelhantes, nosso próximo passo foi investigar se a microbiota intestinal poderia fornecer um sinal para a produção dos anticorpos reativos a antígenos intestinais em animais FcγRIIb^{-/-}. Para isso, a microbiota intestinal de animais WT e FcγRIIb^{-/-} foi depletada a partir da sua sexta semana de vida, por administração do coquetel de antibióticos e os níveis de IgG anti-antígenos intestinais foi mensurado em diferentes tempos. Como resultado, podemos observar que animais FcγRIIb^{-/-} com a microbiota depletada não apresentaram aumento nos níveis de IgG anti-antígenos intestinais a partir da 8ª semana de vida (Figura 21) como encontrado em camundongos FcγRIIb^{-/-} que não sofreram depleção da microbiota. Vale ressaltar que a depleção da microbiota não interferiu nos níveis de IgG anti-antígenos intestinais em animais WT.

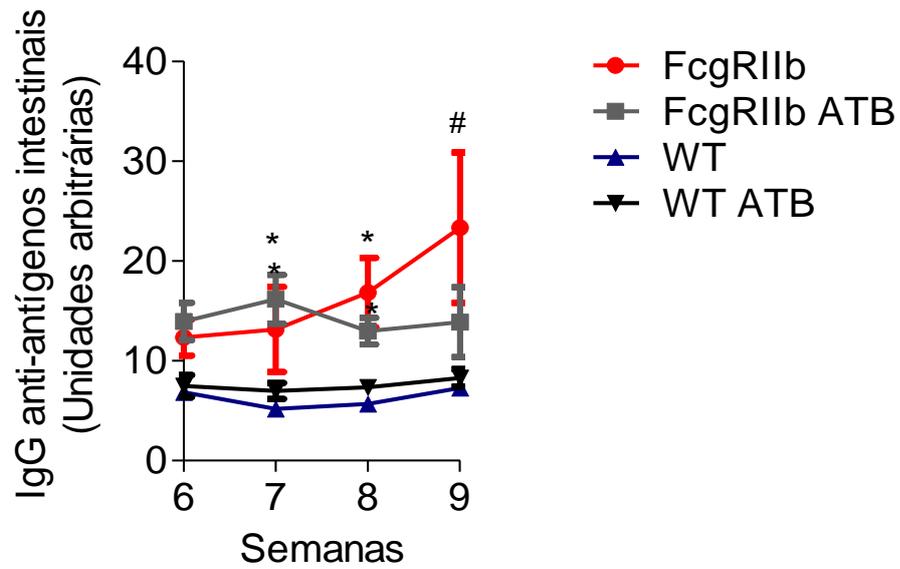


Figura 21- A depleção da microbiota intestinal reduziu os níveis de IgG anti-antígenos intestinais em animais FcγRIIb^{-/-}: Camundongos WT e FcγRIIb^{-/-} foram submetidos ao protocolo de depleção da microbiota a partir da sexta semana de vida e o sangue foi coletado nos tempos de 7,14, 21 e 28 dias de tratamento para avaliação da concentração de IgG anti-antígenos intestinais. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão *P<0,05 vs WT e # P<0,05 vs FcγRIIb^{-/-} ATB. N= 5 a 7.

6 DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado que as imunoglobulinas circulantes exercem importante papel na fisiopatologia da isquemia e reperfusão intestinal, uma vez que os anticorpos naturais reconhecem antígenos expostos nos tecidos isquêmicos, desencadeando uma cascata de eventos que leva à lesão de reperfusão. Neste trabalho, demonstramos que, após a reperfusão do leito isquêmico, ocorre a deposição de IgG no tecido intestinal, o que vai de acordo com demonstrado por Fleming *et al.*, 2002, que demonstraram que ocorre a deposição de IgG no tecido intestinal após IRI. A deposição de IgG durante a lesão de reperfusão nos levou a hipotetizar que receptores do tipo Fc γ R poderiam exercer papel importante na lesão por reperfusão.

Os receptores Fc γ R são amplamente expressos em diversos leucócitos e apresentam papel importante no controle da resposta imune inata e adaptativa frente a diversas doenças inflamatórias, principalmente em doenças autoimunes (BOURNAZOS & RAVETCH, 2017). De forma interessante, no presente trabalho, demonstramos que o receptor Fc γ RIII desempenha importante papel pró-inflamatório durante a lesão de reperfusão. Demonstramos que camundongos deficientes para o receptor Fc γ RIII, um receptor de ativação da resposta inflamatória, apresentam atenuação da lesão induzida por isquemia e reperfusão intestinal. Esta redução da lesão encontrada em animais Fc γ RIII^{-/-} está associada à redução do influxo de neutrófilos para o tecido intestinal e a redução da produção de citocinas pró inflamatórias, uma vez que estes dois fatores são essenciais para o desencadeamento da lesão de reperfusão. Trabalhos do nosso grupo têm demonstrado que a redução do recrutamento de neutrófilos e da produção de citocinas pró-inflamatórias estão associadas com a redução da lesão por reperfusão e diminuição da taxa de letalidade (SOUZA, *Get al.*, 2000; SOUZA, *et al.*, 2004a). Por outro lado, trabalhos do nosso grupo demonstraram que a proteção da lesão induzida por IRI está associado com o aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (SOUZA *et al.*, 2003) No entanto, no presente trabalho, não encontramos associação entre a proteção de animais Fc γ RIII^{-/-} e o aumento da produção dessa citocina. A ausência do aumento dessa citocina pode ser em parte

justificada pela diminuição das citocinas IL-1 β e TNF- α importantes indutores da síntese de IL-10 (SOUZA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2001). Em conjunto, esses dados sugerem que a ativação de Fc γ RIII é importante para o recrutamento de neutrófilos e para a produção de mediadores pró-inflamatórios durante a lesão de reperfusão.

Fleming *et al.*, 2002, demonstraram que a deposição de IgG no tecido intestinal é necessário para o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório frente a IRI e esse recrutamento é mediado pela produção do mediador inflamatório quimioatraente LTB₄. De forma interessante, observamos que a ausência do receptor Fc γ RIII resultou na abolição do aumento da produção da quimiocina CXCL-1, um mediador inflamatório com propriedade quimioatraente para neutrófilos (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Um importante indutor da produção de CXCL-1 é a liberação de IL-17A por células linfóides intestinais (ILCs) após a deposição de auto-anticorpos no tecido intestinal induzido por IRI (GEHA *et al.*, 2017). Dessa forma, em conjunto com os nossos resultados e dados da literatura, propomos que a deposição de IgG no tecido intestinal é responsável pela ativação do receptor Fc γ RIII, amplamente expresso por diversos leucócitos, induzindo a produção IL-17A pelas ILCs que induzem a produção e liberação de mediadores inflamatórios quimioatraentes como a quimiocina CXCL-1 e LTB₄, culminando no recrutamento de neutrófilos para o tecido intestinal, intensa resposta inflamatória, lesão tecidual e letalidade.

Por outro lado, nossos dados sugerem que a presença do receptor Fc γ RIIb é essencial para o controle da lesão induzida por IRI. A ausência do receptor Fc γ RIIb resultou em antecipação e aumento da letalidade após a isquemia e reperfusão intestinal. O aumento da letalidade apresentada por camundongos deficientes para o receptor Fc γ RIIb foi associada com uma intensa lesão tecidual. No entanto, de maneira interessante, a intensa lesão tecidual apresentada por estes animais ocorreu de forma independente do recrutamento de neutrófilos uma vez que, após 1h de reperfusão, esses animais apresentam intensa lesão tecidual sem que haja o recrutamento de neutrófilos para o tecido intestinal. Com uma hora de reperfusão observamos também o aumento da deposição de IgG no tecido intestinal, assim

associamos a deposição dessa imunoglobulina com a maior lesão tecidual nesses animais.

Os auto-anticorpos são anticorpos naturais produzidos por linfócitos do tipo B1 e sua produção é regulada pelo receptor Fc γ RIIb através da regulação da atividade de células B (PANDA & DING, 2015). O papel dos auto-anticorpos na IRI foi demonstrado através do uso de animais B6.MRL/lpr, que desenvolvem espontaneamente características clínicas e sorológicas semelhante ao lúpus sistêmico humano, uma vez que esses animais produzem normalmente concentrações elevadas de auto-anticorpos com múltiplas especificidades, incluindo ssDNA, cromatina, complexos de proteína e RNA e fosfolípidos. Esses animais, quando submetidos a IRI, apresentam intensa lesão tecidual e aumento da produção de LTB4. Interessantemente, a administração de IgG purificado de animais B6.MRL/lpr em animais Rag-1^{-/-} que são resistentes a IRI reverteu a susceptibilidade desses animais em desenvolverem lesão tecidual local e remota nos pulmões (FLEMING *et al.*, 2004). Esses estudos demonstram que o aumento da concentração de auto-anticorpos circulantes aumenta a susceptibilidade a IRI. Assim, dada a maior deposição de IgG durante a IR nos animais Fc γ RIIB^{-/-}, hipotetizamos que esses animais apresentavam maiores concentrações circulantes de auto-anticorpos relevantes para promoção da IRI.

Bolland & Ravetch, 2000 demonstraram que camundongos C57/BL6 idosos deficientes para o receptor Fc γ RIIB também apresentam alteração no perfil de imunoglobulinas, produzindo basalmente altos níveis de IgG auto reativos a DNA e histona e desenvolvendo assim naturalmente glomerulonefrite. Indo de acordo com a literatura, nossos resultados demonstraram que a ausência do receptor Fc γ RIIB resultou na maior produção de IgG auto-reativos a antígenos intestinais na oitava semana de vida, idade no qual realizamos os experimentos de IRI, o que levaria ao maior reconhecimento de antígenos expostos pela isquemia e maior deposição de IgG no tecido intestinal. No presente trabalho não demonstramos quais antígenos a IgG reconhece no tecido intestinal, mas de acordo com trabalhos na literatura, diversos auto-antígenos são expostos pela isquemia como: fosfolípidios, miosina

não muscular, β 2-GPI (β 2-glicoproteína I), DNA e histona poderiam ser reconhecidos por essas imunoglobulinas (FLEMING *et al.*, 2004, FLEMING & TSOKOS, 2006).

A formação de imunocomplexos durante isquemia e reperfusão intestinal induz a fixação e ativação da via do complemento, que é uma via fundamental para a resposta inflamatória e lesão tecidual induzida pela IRI (ZHANG, *et al.*, 2004, 2006). Trabalhos prévios demonstraram que camundongos deficientes para vários componentes do complemento como, C3, C4 e C5 foram protegidos do dano tecidual gerado pela isquemia e reperfusão (FLEMING, 2002; FLEMING 2006). Além disso, o receptor de complemento 2 (Cr2) também é importante para o controle da produção de anticorpos auto-reativos importantes durante a isquemia e reperfusão intestinal (FLEMING *et al.*, 2002). Diante da importância da ativação do sistema do complemento no desencadeamento da lesão de reperfusão de uma forma independente do recrutamento de neutrófilos (FLEMING, 2006), propomos que a produção exacerbada de auto anticorpos reativos em animais deficientes para o receptor Fc γ RIIB é responsável pela ativação acentuada da via do complemento, fazendo com que estes animais apresentem maior lesão tecidual e maior letalidade frente a IRI. De fato, neste trabalho demonstramos que o nível de anticorpos nesses animais está intimamente relacionado com a letalidade induzida por IRI. Uma vez que, a maior taxa de letalidade de animais Fc γ RIIB^{-/-} pode ser revertida através da realização do modelo de IRI em animais Fc γ RIIB^{-/-} com sete semanas de vida, onde encontramos menores níveis de auto anticorpos nesses animais. No entanto, mais experimentos precisam ser realizados para a comprovação da hipótese do sistema do complemento nesta via, como por exemplo a realização da imuno-histoquímica ou imunofluorescência para avaliação da deposição de complemento no tecido intestinal e sua colocalização com a deposição de IgG.

A colonização do intestino pela microbiota intestinal é um importante indutor para a produção de anticorpos naturais auto-reativos essenciais para a lesão tecidual durante a isquemia e reperfusão intestinal (CISALPINO *et al.*, 2017). Interessantemente, através dos nossos resultados foi possível observar que o aumento do título de IgG anti-antígenos intestinais se dá de maneira concomitante ao aumento do título de IgG anti-microbiota fecal nos camundongos Fc γ RIIB^{-/-}. Esses resultados nos fizeram sugerir que a microbiota intestinal poderia ser um sinal para a

produção de anticorpos naturais auto-reativos nesses camundongos. De fato, podemos observar que a depleção da microbiota intestinal em camundongos $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ foi capaz de prevenir o aumento da produção de auto-anticorpos a partir da sétima semana de vida. No presente trabalho, não demonstramos qual grupo bacteriano da microbiota intestinal poderia ser o responsável pela indução da produção desses auto-anticorpos. Levando em conta que as bactérias Gram-negativo presentes na microbiota intestinal são importantes para a indução da produção de IgG reativos a antígenos da microbiota fecal (Zang *et al.*, 2015), acreditamos que esse grupo bacteriano poderia ser um sinal importante para a produção de auto-anticorpos relevantes para a IRI. A microbiota parece controlar a produção de IgG reativos a antígenos da microbiota fecal via a ativação de TLR2 e TLR4. Interessantemente, um estudo demonstrou que animais deficientes para o receptor TLR-2 apresentam menor deposição de IgM no tecido intestinal e, por consequência, menor lesão tecidual após IRI, (POPE & FLEMING, 2014), o que nos permite sugerir que a ativação de TLRs pela microbiota indígena seria importante também para a promoção da produção de auto-anticorpos relevantes para o desencadeamento da IRI. Dessa forma, em conjunto com nossos resultados sugerimos que o receptor $Fc\gamma RIIB$ é importante para a lesão de reperfusão por controlar a produção de IgG reativo a antígenos intestinais. E que a produção descontrolada desses anticorpos parece envolver a colonização do intestino pela microbiota intestinal.

Resumidamente, no presente trabalho demonstramos que: (1) ocorre deposição de IgG no tecido intestinal; (2) o receptor $Fc\gamma RIIB$ é importante para controlar a resposta inflamatória e por consequência a lesão de reperfusão; (3) o receptor $Fc\gamma RIIB$ é importante para inibir a lesão de reperfusão; (4) a importância do receptor $Fc\gamma RIIB$ na lesão de reperfusão se dá através do controle da produção de IgG reativos a antígenos do tecido intestinal; (5) a microbiota intestinal parece ser um sinal importante para a indução da produção de IgG de importância na lesão de reperfusão em camundongos $Fc\gamma RIIB^{-/-}$. Dessa forma, devido à importância clínica da IRI propomos que o receptor $Fc\gamma RIIB$ pode ser um alvo promissor para a imunoterapia dessa doença inflamatória, uma vez que há uma busca constante de alvos terapêuticos que buscam atenuar os efeitos lesivos da IRI. Por outro lado, os

nossos dados indicam que pessoas que apresentem alteração da expressão do gene que codifica o receptor Fc γ RIIB podem ser mais susceptíveis a lesão de reperfusão. Demonstrando que os receptores Fc γ RIII e Fc γ RIIB participam de maneiras distintas da fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão intestinal.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., Lichtman, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 8^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ANDERSON, J *et al.*,. Intravenous immunoglobulin attenuates mesenteric ischemia–reperfusion injury. **Clinical Immunology**, v. 114, n. 2, p. 137-146, 2005.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **Journal of Clinical Investigation**, 2008. v. 118, n. 2, p. 413–420.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2214713>>.

BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, 2016. v. 535, n. 7610, p. 85–93. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature18849>>.

BOURNAZOS, S.; RAVETCH, J. V. Fc γ receptor pathways during active and passive immunization. **Immunological Reviews**, 2015. v. 268, n. 1, p. 88–103.

BOURNAZOS, S.; RAVETCH, J. V. Fc γ Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies. **Immunity**, 2017. v. 47, n. 2, p. 224–233. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761317303163>>.

CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nature Reviews Immunology**, 2010. v. 10, n. 10, p. 735–744. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2850>>.

CHOUCHANI, E. T. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. **Nature**, 2014. v. 515, n. 7527, p. 431–435. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature13909>>.

CISALPINO, D. *et al.* Microbiota-Induced Antibodies Are Essential for Host Inflammatory Responsiveness to Sterile and Infectious Stimuli. **The Journal of Immunology**, 2017. v. 198, n. 10, p. 4096–4106. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1600852>>.

DALY, M. C. *et al.* Role of matrix metalloproteinase-8 as a mediator of injury in intestinal ischemia and reperfusion. **FASEB Journal**, 2016. v. 30, n. 10, p. 3453–3460.

DHARAJIYA, N. *et al.* Fc γ R1b inhibits allergic lung inflammation in a murine model of allergic asthma. **PLoS ONE**, 2010. v. 5, n. 2, p. 22–24.

ECKBURG, P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, 2005. v. 308, n. 5728, p. 1635–1638. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1110591>>.

ESP, M.; SMITH, K. G. C. Fc γ c R1b and autoimmunity. 2016. v. 269, p. 194–211.

FAGUNDES, C. T. *et al.* Adapting to environmental stresses: The role of the microbiota in controlling innate immunity and behavioral responses. **Immunological Reviews**, 2012. v. 245, n. 1, p. 250–264.

FLEMING, S. D. Natural antibodies, autoantibodies and complement activation in tissue injury. **Autoimmunity**, 2006. v. 39, n. 5, p. 379–386.

KATADA, K. *et al.* Therapeutic roles of carbon monoxide in intestinal ischemia-reperfusion injury. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, 2015. v. 30, n. S1, p. 46–52.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, 2013. v. 13, n. 3, p. 159–175. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3399>>.

LAY, C. *et al.* Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. **Environmental Microbiology**, 2005. v. 7, n. 7, p. 933–946.

LYCKE, N. Y.; BEMARK, M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. **Mucosal Immunology**, 2017. n. May, p. 1–14. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/mi.2017.62>>.

MAHOWALD, M. A. *et al.* Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009. v. 106, n. 14, p. 5859–5864. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0901529106>>.

MCCOY, K. D.; RONCHI, F.; GEUKING, M. B. Host-microbiota interactions and adaptive immunity. **Immunological Reviews**, 2017. v. 279, n. 1, p. 63–69.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 2008. v.

454, n. 7203, p. 428–435. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07201>>.

NAKAMURA, A. *et al.* Fcγ receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. **The Journal of experimental medicine**, 2000. v. 191, n. 5, p. 899–906. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2195851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NETEA, M. G. *et al.* A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, 2017. v. 18, n. 8, p. 826–831. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3790>>.

NIMMERJAHN, F. Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. **Science**, 2005. v. 310, n. 5753, p. 1510–1512. Disponível em:

<<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1118948>>.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, 2008. v. 8, n. 1, p. 34–47. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2206>>.

QUAST, I.; LÜNEMANN, J. D. Fc glycan-modulated immunoglobulin G effector functions. **Journal of Clinical Immunology**, 2014. v. 34, n. SUPPL. 1, p. 51–55.

RAVETCH, J. V.; BOLLAND, S. *I g f r.* 2001.

ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**, 2016. v. 16, n. 6, p. 341–352. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri.2016.42>>.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, 2009. v. 9, n. 8, p. 600–600. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2614>>.

SCHUIJT, T. J. *et al.* The intestinal microbiota and host immune interactions in the critically ill. **Trends in Microbiology**, 2013. v. 21, n. 5, p. 221–229. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.02.001>>.

SCHWAB, I.; NIMMERJAHN, F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? **Nature Reviews Immunology**, 2013. v. 13, n. 3, p. 176–189. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nri3401%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/nri3401>>.

SMITH, K. G. C.; CLATWORTHY, M. R. Europe PMC Funders Group Fc γ RIIb in autoimmunity and infection : evolutionary and therapeutic implications. 2014. v. 10, n. 5, p. 328–343.

SOUZA, D. G. *et al.* Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British journal of pharmacology**, 2000. v. 131, n. 8, p. 1800–1808.

SOUZA, D. G. *et al.* Effects of inhibition of PDE4 and TNF- α on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **British Journal of Pharmacology**, 2001. v. 134, p. 985–994.

SOUZA, D. G. *et al.* Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. **British journal of pharmacology**, 2003. v. 139, n. 4, p. 733–40. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1573892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SOUZA, D. G. *et al.* IL-1-Driven Endogenous IL-10 Production Protects Against the Systemic and Local Acute Inflammatory Response Following Intestinal Reperfusion Injury. **The Journal of Immunology**, 2003. v. 170, n. 9, p. 4759–4766. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.170.9.4759>>.

SOUZA, D. G. *et al.* The Essential Role of the Intestinal Microbiota in Facilitating Acute Inflammatory Responses. **The Journal of Immunology**, 2004. v. 173, n. 6, p. 4137–4146. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.6.4137>>.

SOUZA, D. G. *et al.* Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury.

British journal of pharmacology, 2004. v. 143, n. 1, p. 132–42. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1575259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SOUZA, D. G. *et al.* The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice.

Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2007. v. 179, n. 12, p. 8533–43.

Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/179/12/8533.full>>.

TAKAI, T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. **Nature reviews. Immunology**,

2002. v. 2, n. 8, p. 580–592.

TAKAI, T. Fc Receptors and Their Role in Immune Regulation and Autoimmunity.

2005. v. 25, n. 1, p. 1–18.

THEVARANJAN, N. *et al.* Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. **Cell Host and Microbe**, 2017. v. 21, n. 4, p. 455–466.e4.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, 2014. v. 5, n. OCT, p. 1–17.

WINTER, S. E.; BÄUMLER, A. J. Dysbiosis in the inflamed intestine: Chance favors the prepared microbe. **Gut Microbes**, 2014. v. 5, n. 1, p. 71–73.

WINTER, S. E.; LOPEZ, C. A.; BÄUMLER, A. J. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. **EMBO reports**, 2013. v. 14, n. 4, p. 319–327. Disponible em: <<http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/embor.2013.27>>.

YUASA, T. *et al.* Deletion of fcγ receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. **The Journal of experimental medicine**, 1999. v. 189, n. 1, p. 187–94. Disponible em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ZENG, M. Y. *et al.* Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. **Immunity**, 2016. v. 44, n. 3, p. 647–658.