

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Micheli Fagundes

**PAPEL DAS IMUNOGLOBULINAS G NO CONTROLE E RESOLUÇÃO DA
DISBIOSE INTESTINAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE
ULCERATIVA**

Belo Horizonte

2021

Micheli Fagundes

**PAPEL DAS IMUNOGLOBULINAS G NO CONTROLE E RESOLUÇÃO DA
DISBIOSE INTESTINAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE
ULCERATIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza.

Belo Horizonte

2021

043

Fagundes, Micheli.

Papel das imunoglobulinas G no controle e resolução da disbiose intestinal em modelo experimental de colite ulcerativa [manuscrito] / Micheli Fagundes. - 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes. Coorientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Disbiose. 3. Microbioma Gastrointestinal. 4. Imunoglobulina G. 5. Receptores de IgG. I. Fagundes, Caio Tavares. II. Souza, Danielle da Glória de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **MICHELI FAGUNDES**

Nº REGISTRO: **2016751953**

Às 09:30 horas do dia **09 de julho de 2021**, reuniu-se, po via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Elisabeth Neumann (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Gustavo Batista de Menezes (UFMG), Luciana de Pádua Tavares (Harvard Medical School), Leonardo Borges Acúrcio (Centro Universitário de Formiga) e o Prof. Caio Tavares Fagundes – Orientador, para julgar o trabalho final "Papel das Imunoglobulinas G No Controle e Resolução da Disbiose Intestinal Em Modelo Experimental de Colite Ulcerativa", da aluna **Micheli Fagundes**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Caio Tavares Fagundes, 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, 09 de julho de 2021. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da banca:

Profa. Dra. Elisabeth Neumann

Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Profa. Dra. Luciana de Pádua Tavares

Prof. Dr. Leonardo Borges Acúrcio

De acordo:

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

(Orientador)

Profa. Danielle da Glória de Souza
(Coordenadora)

Belo Horizonte, 09 de julho de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 12/07/2021, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 12/07/2021, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 13/07/2021, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Borges Acurcio, Usuário Externo**, em 13/07/2021, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Padua Tavares, Usuário Externo**, em 14/07/2021, às 12:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Batista de Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 09/08/2021, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0783314** e o código CRC **18B503E7**.

RESUMO:

A perturbação da homeostase microbiana, caracterizado como disbiose, está relacionada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Dentre as doenças inflamatórias intestinais, destacamos a colite ulcerativa cuja fisiopatologia envolve a microbiota intestinal. Sabe-se que a inflamação intestinal decorrente da colite ulcerativa causa exposição de novos antígenos ao sistema imune. Dentre vários componentes do sistema imune, temos as imunoglobulinas, que, dentre outras funções, estão envolvidas na neutralização de microrganismos, evitando a adesão e translocação deles. No entanto, pouco se sabe se as imunoglobulinas G, foco desse trabalho, desempenham algum papel durante a disbiose induzida pela colite ulcerativa. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel das imunoglobulinas G no controle e resolução da disbiose intestinal em um modelo murino de colite ulcerativa. A partir dos nossos resultados foi observado que, após a indução da colite, há marcante disbiose da microbiota intestinal, avaliada pela expansão de enterobactérias no conteúdo luminal e nas fezes dos camundongos submetidos à indução da colite. Concomitantemente à disbiose, houve aumento nas concentrações de IgG no lúmen do cólon e fezes. Foi observado também que esses anticorpos eram reativos a antígenos extraídos da microbiota fecal disbiótica e a antígenos extraídos de bactérias que foram isoladas ao longo da colite. Ainda, há aumento da percentagem de bactérias ligadas a IgG durante o pico da disbiose induzida pela colite ulcerativa. Interessantemente, após os animais serem tratados com coquetel de antimicrobianos durante a disbiose, houve redução de todos esses parâmetros, demonstrando assim que essa resposta era dependente da microbiota intestinal disbiótica. Animais deficientes na produção de Imunoglobulinas se mostraram mais susceptíveis à colite, com manifestações clínicas mais intensas e translocação de bactérias para a circulação sanguínea. Parte desse fenótipo foi revertido pela administração de antimicrobianos ou pela injeção de IgG purificada de animais selvagens. Animais deficientes na expressão dos receptores de IgG FcγRIIB, mas não na expressão de FcγRIII, também apresentaram susceptibilidade acentuada à colite, com manifestações clínicas mais intensas e adiantada translocação de bactérias para a circulação sanguínea, efeitos revertidos pela administração de antimicrobianos. Mecanicamente, a susceptibilidade dos animais com deficiência na expressão de FcγRIIB foi associada a alteração na expressão da enzima NOS2. O tratamento com o inibidor de NOS2 aminoguanidina impediu a expansão de enterobactérias na microbiota disbiótica e a consequente translocação de

bactérias para a circulação nesses animais. Em conclusão, esses dados permitem sugerir que IgG controla a translocação de enterobactérias para a circulação sanguínea após expansão das mesmas no lúmen do cólon durante a colite ulcerativa por inibir a produção de óxido nítrico mediada por NOS2 em um mecanismo envolvendo a ativação do receptor FcγRIIB.

ABSTRACT:

The disturbance of microbial homeostasis, defined as dysbiosis, is related to the development of inflammatory bowel diseases. Among the inflammatory bowel diseases, we highlight ulcerative colitis whose pathophysiology involves the intestinal microbiota. The intestinal inflammation due to ulcerative colitis is known to cause exposure of new antigens to the immune system. Among several components of the immune system, immunoglobulins are major players involved in the neutralization of microorganisms, preventing their adhesion and translocation. However, little is known whether immunoglobulins G, the focus of this work, play any role during dysbiosis induced by ulcerative colitis. Therefore, the objective of this work was to evaluate the role of immunoglobulins G in the control and resolution of intestinal dysbiosis in a murine model of ulcerative colitis. It was observed that, after the induction of colitis, there is marked dysbiosis of the intestinal microbiota, assessed by the expansion of enterobacteria in the luminal content and in the feces of mice during the induction of colitis. Concomitantly with dysbiosis, there was an increase in IgG concentration in the lumen of the colon and feces. It was also observed that these antibodies bind to antigens extracted from the dysbiotic fecal microbiota and antigens extracted from bacteria that have been isolated from feces of colitic mice. In addition, there is an increase in the percentage of IgG-bound bacteria during the peak of dysbiosis induced by ulcerative colitis. Interestingly, after animals were treated with an antimicrobial cocktail after dysbiosis onset, there was a reduction in all these parameters, thus demonstrating that this response was dependent on the dysbiotic intestinal microbiota. Animals deficient in the production of immunoglobulins were more susceptible to colitis, with more intense clinical manifestations and earlier translocation of bacteria into the bloodstream. Part of this phenotype has been reversed by the administration of antimicrobials or by injecting purified IgG from wild-type animals. Animals deficient in the expression of IgG receptors Fc γ RIIB, but not animals deficient in the expression of Fc γ RIII, also showed marked susceptibility to colitis, with more intense clinical manifestations and early translocation of bacteria into the bloodstream, effects reversed by the administration of antimicrobials. Mechanistically, susceptibility of animals with deficiency in the expression of Fc γ RIIB was associated with increased expression of the NOS2 enzyme in tissue. Treatment with the NOS2 inhibitor aminoguanidine prevented the expansion of enterobacteria in the dysbiotic microbiota and the consequent translocation of bacteria to the circulation in these animals. In conclusion, these data suggest that IgG controls the translocation of enterobacteria

into the bloodstream after its expansion in the colon lumen and during ulcerative colitis by inhibiting NOS2-mediated nitric oxide production in a mechanism involving the activation of FcγRIIB receptor.

SUMÁRIO:

RESUMO:	1
ABSTRACT:	3
LISTA DE FIGURAS:	7
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	10
REVISÃO DA LITERATURA:	13
O INTESTINO E A MICROBIOTA INTESTINAL	13
DISBIOSE E COLITE ULCERATIVA	19
OXIDO NÍTRICO E COLITE ULCERATIVA	21
IMUNOGLOBULINAS E A MICROBIOTA INTESTINAL	23
JUSTIFICATIVA:	31
OBJETIVOS:	33
OBJETIVO GERAL:	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
METODOLOGIA:	35
ANIMAIS E EUTANÁSIA:	35
INDUÇÃO DA COLITE:	36
TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANOS, AMINO Guanidina E COM IgG PURIFICADO:	36
DETERMINAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO	36
AVALIAÇÃO DA DISBIOSE DA MICROBIOTA INTESTINAL	37
OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE BACTÉRIAS FECAIS	37
OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE ISOLADOS BACTERIANOS DISBIÓTICOS	37
QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS BACTERIANOS	38
ELISAs	38
OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	38
QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgA, IgG E IgM TOTAIS	38
QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MICROBIOTA FECAL	39
QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-EXTRATOS BACTERIANOS DISBIÓTICOS	40
PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgG DO SORO DE CAMUNDONGOS:	40
AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO E FRACIONAMENTO DO CÓLON:	41
ANÁLISE HISTOLÓGICA:	41
ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA ENZIMA NOS2	42
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	42
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE N-ACETILGLICOSAMINIDASE (NAG)	43

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO).....	44
MARCAÇÃO DE BACTÉRIAS FECAIS E LUMINAIS E CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAR DEPOSIÇÃO DE IgG:.....	44
ANÁLISE ESTATÍSTICA:.....	45
RESULTADOS:	46
DISCUSSÃO:	73
REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Defesas imunológicas contra bactérias intestinais comensais.

Figura 2: Janela de oportunidade para modulação da microbiota da gestação à infância.

Figura 3: Visão geral da família dos receptores Fc γ e padrões de expressão entre leucócitos e fatores humanos.

Figura 4: Estratégia para análise da deposição de imunoglobulinas em bactérias fecais e luminais.

Figura 5: A indução da colite ulcerativa com DSS leva à expansão do número de Enterobactérias nas fezes dos camundongos.

Figura 6: Anticorpos induzidos pela microbiota são mais reativos à microbiota disbiótica.

Figura 7: Concentração fecal de IgG aumenta após a indução da colite concomitantemente à redução do conteúdo de Enterobactérias nas fezes.

Figura 8: Curso temporal das alterações clínicas induzidas pela administração de DSS a camundongos.

Figura 9: Curso temporal das alterações histopatológicas do cólon de animais submetidos a indução da colite ulcerativa.

Figura 10: Avaliação temporal do influxo de leucócitos para o cólon de animais submetidos a colite ulcerativa.

Figura 11: Avaliação temporal do conteúdo de bactérias anaeróbias facultativas na microbiota de animais com colite ulcerativa.

Figura 12: Microbiota disbiótica promove lesão tecidual e pode levar a translocação de bactérias para a circulação dos animais doentes.

Figura 13: Avaliação temporal da concentração de imunoglobulinas nas fezes de animais submetidos ao modelo de colite ulcerativa.

Figura 14: Há aumento da concentração de IgG reativo a microbiota disbiótica nas fezes de animais submetidos a colite ulcerativa.

Figura 15: Há presença de IgG ligada a bactérias no lúmen mas não nas fezes dos animais submetidos a colite ulcerativa.

Figura 16: Há IgG ligada em bactérias do lúmen 15 dias após a indução da colite.

Figura 17: O tratamento com um coquetel de antimicrobianos impede o aumento da concentração de IgG anti-microbiota nas fezes de camundongos submetidos ao modelo de colite ulcerativa.

Figura 18: O tratamento com um coquetel de antimicrobianos impede o aumento da ligação de IgG a bactérias fecais durante a colite ulcerativa.

Figura 19: Animais $MuT^{-/-}$ apresentam maior letalidade e susceptibilidade a doença quando comparado aos animais WT.

Figura 20: Tratamento de animais $MuT^{-/-}$ submetidos a colite com mix de antimicrobianos reverte o fenótipo de susceptibilidade a doença e a translocação bacteriana para a circulação dos animais.

Figura 21: Alterações histopatológicas do cólon de animais submetidos a indução da colite ulcerativa.

Figura 22: Administração de IgG provenientes de animais selvagens para animais $MuT^{-/-}$ reverte o fenótipo de susceptibilidade a doença.

Figura 23: Animais deficientes do receptor $Fc\gamma RIIB$ apresentam maior letalidade quando comparado a animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e WT.

Figura 24: Animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ apresentam maior translocação bacteriana para o fígado em comparação aos animais WT e $Fc\gamma RIIB^{-/-}$.

Figura 25: Alterações histopatológicas do cólon de animais submetidos a indução da colite ulcerativa e tratados com coquetel de antimicrobianos

Figura 26: Animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ apresentam maior quantidade de células $NOS2^+$ oito dias após indução da colite

Figura 27: Tratamento dos animais $Fc\gamma RIIB$ submetidos a colite com aminoguanidina melhora a doença.

Figura 28: Tratamento de animais submetidos a colite com aminoguanidina impediu expansão de enterobactérias e translocação de bactérias para a circulação em animais FcyRIIB^{-/-}.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPs = Peptídeos antimicrobianos

AG = aminoguanidina

APC= célula apresentadora de antígeno

BCR= Receptor de célula B

CV = Convencional

CVN = Convencionalizado

DC = Célula dendrítica

DII = Doença inflamatória intestinal

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DSS= Dextran Sodium Sulfate- Sulfato de sódio dextran

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay – ensaio imunossorvente ligado a enzima

Fc = Fragmento cristalino

FcR = receptor de porção Fc de imunoglobulina

GALTS = Tecidos linfoides associados ao intestino

GF = *Germ Free* – isentos de germes

IBD = *Inflammatory Intestinal Disease* – Doenças inflamatórias intestinais

IgA= Imunoglobulina A

IgG = Imunoglobulina G

IgM =Imunoglobulina M

ITAM = Imunorreceptor de ativação baseado em tirosina

ITIM = Imunorreceptor de inibição baseado em tirosina

FACS = *flow cytometry* - citometria de fluxo

FcγR = Receptor de porção Fc de imunoglobulina

EPO = Peroxidase eosinofílica

L-Arg = L-arginina

LPS = Lipopolissacarídeo

PRR = Receptor de Reconhecimento de Padrão

MLP = Lipoproteína mureína

MPO = Enzima mieloperoxidase

MuT = *Cadeia μ transmembrana*

NAG = N-acetilglicosaminidase

NO = *nitric oxide* - Óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintase

OD = Optical density – densidade óptica

OPD = O-phenylenediamine dihydrochloride – diidrocloreto de o-fenilenediamina

PAMP = Pathogen-associated molecular pattern – Padrão molecular associado a patógenos

PIgR = *Polymeric Immunoglobulin Receptor* – Receptor polimérico de imunoglobulina

PBS = Phosphate-buffered saline – salina tamponada por fosfato

RAG = *Recombinase-activating gene* – Gene ativador de recombinase

RNS = Espécies reativas de nitrogênio

RPM = Rotações por minuto

ROS = Espécies reativas de oxigênio

SIg = Imunoglobulinas secretadas

TFH = Células auxiliares foliculares T

TLRs = Receptores do tipo toll

WT = wild type – selvagem

UC = *Ulcerative Colitis* – Colite ulcerativa

UFC = Unidades formadoras de colônias

µg/mL = micrograma por mililitro, unidade de medida de concentração

REVISÃO DA LITERATURA:

O INTESTINO E A MICROBIOTA INTESTINAL

Iniciarei essa tese com uma frase milenar, proferida pelo pai da medicina, Hipócrates: “*All diseases begin in the gut.*” – Todas as doenças começam no intestino. Pelo fato de ser um órgão complexo e de grande importância para manutenção da saúde do seu hospedeiro, desde o princípio, o intestino intrigava muitos estudiosos. O intestino é um órgão essencial que tem como função principal a digestão, fazendo uma conexão importante com o meio externo, além de, ultimamente, ser considerado como o segundo cérebro (CRYAN *et al.* 2019).

O intestino é um órgão que possui sistema linfóide próprio e apresenta uma das principais e mais efetivas barreiras contra a proliferação de patógenos, que de forma recorrente passeiam pelo intestino trazidos por fontes externas, como por exemplo, os alimentos. O epitélio do intestino é formado por uma camada única de células epiteliais intestinais, que inclui enterócitos, células caliciformes, células de Paneth e células entero-endócrinas que coletivamente cobrem uma área superficial de 400 m², justapostas em numerosos vilos e criptas. Manter a integridade dessa barreira é essencial para isolar o hospedeiro de microrganismos, mantendo assim a homeostase. No epitélio intestinal encontram-se receptores de superfície, como os receptores do tipo Toll (TLRs), e intracelulares, como os receptores do tipo NOD (NLRs), para identificar microrganismos ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que tenham ultrapassado a barreira epitelial, por meio do reconhecimento de elementos microbianos como flagelina, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS), entre outros (ZHENG *et al.* 2020).

A relação simbiótica entre hospedeiros mamíferos e bactérias comensais é resultado de milhões de anos de coevolução e é fundamentalmente benéfica. O intestino dos mamíferos fornece um microambiente favorável para bactérias, estável em temperatura e rico em nutrientes. Entre as funções benéficas, a microbiota intestinal desempenha um papel central na formação do sistema imune intestinal (SASSONE-CORSI & RAFFATELLU, 2015; KAYAMA, OKUMURA, TAKEDA, 2020), contribuindo para o desenvolvimento e maturação do sistema imunológico, aquisição de nutrientes, aumentando a capacidade metabólica do intestino, fornecendo assim uma gama de nutrientes essenciais para o hospedeiro (MILANI 2016). Outro benefício importante conferido pela microbiota intestinal é a resistência contra a colonização por patógenos. Tal resistência à colonização se dá pelo fato das bactérias intestinais formarem

uma barreira que impede a incursão de novas bactérias de outras espécies ou de outras cepas da mesma espécie (ROLHION, CHASSAING. 2016).

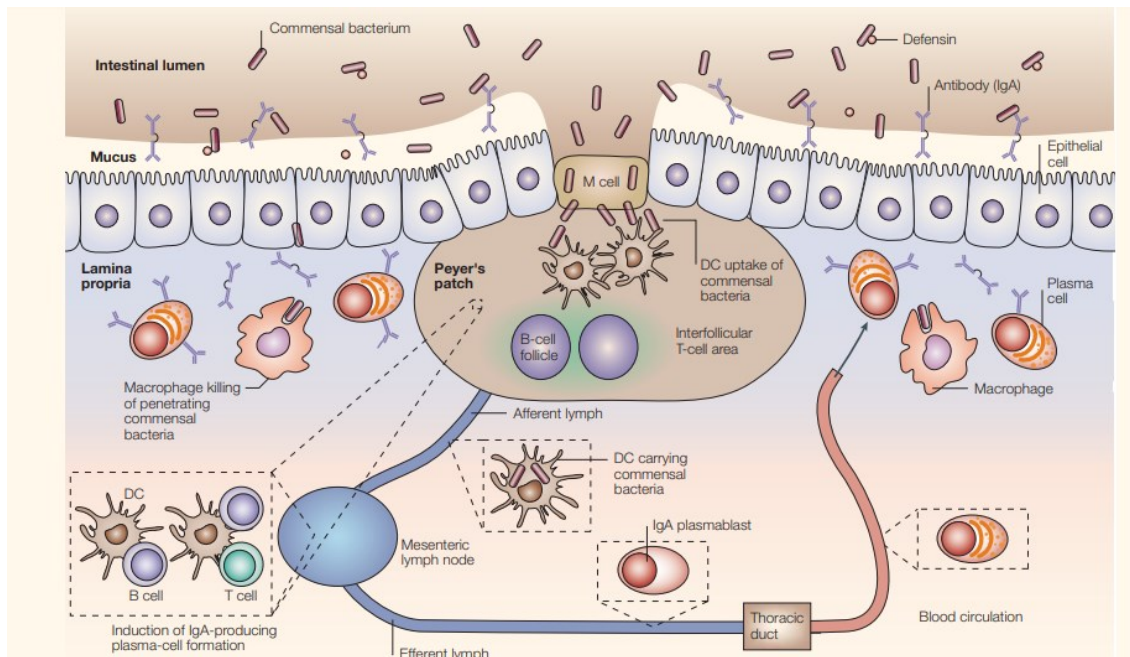


Figura 1: Defesas imunológicas contra bactérias intestinais comensais. Bactérias comensais estão presentes em alta densidade no lúmen intestinal (até 10^{14} bactérias por grama de conteúdo luminal). A maioria das bactérias comensais reside fora da camada de muco que cobre as células epiteliais intestinais. Algumas bactérias podem ser eliminadas por moléculas antibacterianas, como as defensinas, que são produzidas pelas células epiteliais. As bactérias que penetram na camada epitelial dos enterócitos são rapidamente eliminadas pelos macrófagos na lâmina própria. Bactérias comensais também podem penetrar no epitélio associado ao folículo especializado, contendo células M, que fica sobre as placas de Peyer. Essas bactérias também são eliminadas rapidamente por macrófagos, mas um pequeno número pode sobreviver por vários dias em células dendríticas. Isso permite a interação de Células dendríticas com células T e B nas placas de Peyer e / ou a migração de células dendríticas para os linfonodos mesentéricos drenantes. Os linfonodos mesentéricos funcionam como uma barreira e as células dendríticas carregadas não podem penetrar mais longe para alcançar os tecidos linfóides secundários sistêmicos. Após a ativação, células B e T podem deixar os linfonodos mesentéricos através da linfa eferente e entrar na corrente sanguínea pelo ducto torácico e retorna à mucosa intestinal. Imagem retirada e adaptada de (MACPHERSON & HARRIS, 2004).

Muitos estudos comprovam que nascemos livres de microrganismos, e começamos a adquirir nossas espécies indígenas logo após nascimento. A colonização é iniciada por bactérias adquiridas da mãe durante o parto e amamentação. A sequência e biodiversidade da colonização são influenciadas por diversos fatores como idade gestacional, tipo de parto, tipo

de alimentação, estresse, e tratamentos com antibióticos (FAGUNDES, *et al.* 2011). A estabilidade característica da microbiota indígena é adquirida após os primeiros dois anos de vida, em humanos, quando a colonização intestinal atinge seu clímax. A primeira semana de vida de um recém-nascido é dominada por anaeróbios facultativos, e são esses microrganismos que tornam o ambiente propício para a colonização por anaeróbios estritos, porque os microrganismos facultativos consomem o oxigênio, alteram o pH e produzem CO₂ e nutrientes (RUTTEN, 2015). Flutuações transitórias podem existir na composição da microbiota do indivíduo sob certas circunstâncias, como durante doenças diarreicas agudas, uso de antibióticos ou determinadas dietas, mas a microbiota tende a voltar à sua composição típica, característica conhecida como resiliência (SHIN *et al.* 2015).

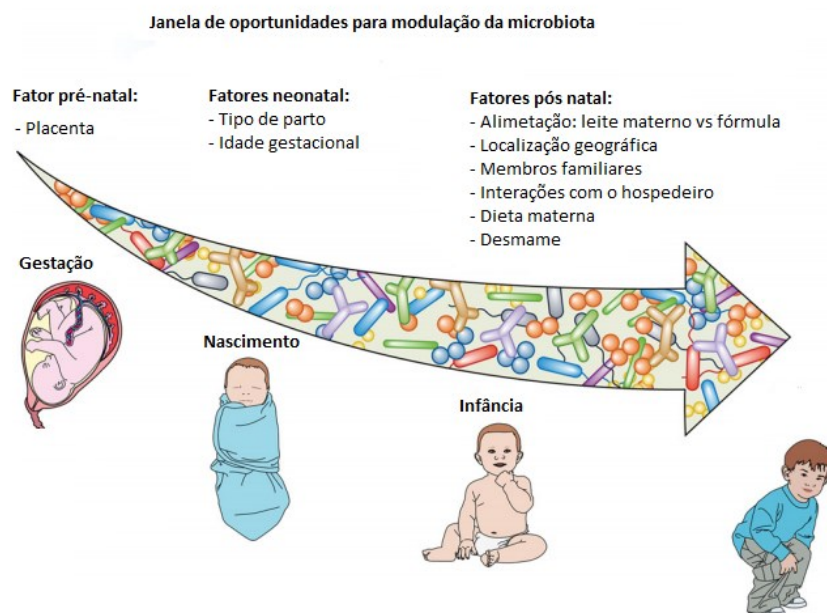


Figura 2: Janela de oportunidade para modulação da microbiota da gestação à infância. A ilustração demonstra uma lista de fatores pré-natais, neonatais e pós-natais que contribuem para o desenvolvimento bacteriano e composição intestinal em bebês. Imagem retirada e adaptada de (MILANI 2017).

O intestino é o órgão humano mais amplamente colonizado, com cerca de 10^{13} a 10^{14} células microbianas na porção terminal do intestino de um humano adulto (LIN, 2014). Essa comunidade é composta por pelo menos 500 diferentes espécies bacterianas. Os anaeróbios obrigatórios compreendem a maior parte da microbiota intestinal em adultos e utilizam a fermentação de polissacarídeos complexos como substrato nutricional (MAHOWALD, 2009).

Por exemplo, a microbiota facilita a fermentação de substratos não-digeríveis e do muco endógeno (LOTZ, 2007).

A microbiota intestinal de cada indivíduo é única em nível de gênero e espécie, porém a microbiota de indivíduos saudáveis adultos é conservada em nível de filos, sendo cinco filos majoritariamente representados: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia (Bäumler & Sperandio, 2016). Além destes filos de bactérias dominantes, o trato digestivo humano também abriga o organismo metanogênico *Methanobrevibacter smithii*, que pertence ao domínio Archaea, ordem taxonômica subdominante em indivíduos saudáveis, bem como organismos eucarióticos, tais como leveduras do gênero *Candida*. Enquanto metanogênicos e leveduras contribuem para menos de 1% de todas as células microbianas da microbiota fecal, Firmicutes e Bacteroides em conjunto podem atingir uma proporção de mais de 90%, enquanto a proporção de representantes de outros filos varia de 2% a 10% (TURNBAUGH PJ, *et al.*2009).

O filo Firmicutes é a divisão mais numerosa e diversa encontrada no intestino (MANICHANH, 2012). É composto por bactérias Gram-positivo, representado principalmente por espécies da classe *Clostridia*, em humanos, e pelo gênero *Lactobacillus* em camundongos. O filo Bacteroidetes, o segundo mais numeroso, é composto por bactérias Gram-negativo, representado por várias espécies de *Bacteroides*, incluindo *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. fragilis* e *B. ovatus* (ECKBURG, *et al.*, 2005). Já as bactérias do filo Actinobacteria são Gram-positivo e apresentam organização filamentosa e muito ramificada. Espécies do gênero *Bifidobacterium* são comumente encontradas colonizando o colón de humanos e camundongos (WINTER & BÄUMLER, 2014). O filo Proteobacteria é formado por bactérias Gram-negativo. A família Enterobacteriaceae, representada pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, entre outros, são subdominantes na microbiota, entretanto o aumento no número de representantes desse grupo está associado com diversas doenças inflamatórias intestinais (WINTER & BÄUMLER, 2014).

Na microbiota gastrointestinal de camundongos, assim como em humanos, é encontrado aproximadamente 99% da microbiota dominada por bactérias dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia e Cianobactéria (MANICHANH, 2012). Além das bactérias, a microbiota intestinal de camundongos também é composta por algumas espécies de arqueias e fungos, como as *Methanobrevibacter* e *Candida*

albicans, respectivamente (FAGUNDES, *et al.* 2011), bem como fagos e outros vírus (SAULNIER, 2013).

A tolerância à microbiota é mediada por múltiplos fatores, e envolve mecanismos que incluem desde mínima exposição, até reconhecimento imune da microbiota indígena e inibição da resposta imune através de diversos mecanismos (CHISTIYAKOV DA, *et al.* 2015). A microbiota intestinal normalmente está sempre em equilíbrio mútuo com o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que é o maior tecido imunológico do corpo. Os microrganismos intestinais são a principal fonte de antígenos naturais que estimulam continuamente o tecido linfóide associado ao intestino induzindo assim a tolerância imunológica da mucosa. Além disso, a presença de GALTs é necessária para prevenir uma resposta imunológica pró-inflamatória aguda contra a microbiota, resultando em doenças intestinais inflamatórias. Ao longo de todo o processo evolutivo, o hospedeiro desenvolveu diversas estratégias para minimizar o contato entre a superfície epitelial do intestino e os microrganismos intestinais e com isso limitar a presença de microrganismos simbiotes com potencial de penetrar essa barreira que poderiam desencadear respostas inflamatórias indesejadas, como por exemplo a secreção de glicoproteínas como a mucina 2 (MUC2) pelas células caliciformes (CORNICK, *et al.* 2019). A MUC2 forma uma barreira na mucosa que impede os microrganismos do lúmen do intestino de fazer contato com o epitélio. Um exemplo da importância da MUC2 para o hospedeiro é melhor exemplificada em um trabalho onde os autores utilizaram camundongos *Muc2^{-/-}*, que são camundongos deficientes de MUC2, e esses animais demonstraram aumento da colonização de bactérias na superfície epitelial, aumento da susceptibilidade à colite e desenvolvimento de câncer colorretal (BERGSTROM KS, *et al.* 2010; VAN DER S M, *et al.* 2006).

Outro fator importante envolvido na tolerância a microbiota intestinal são as chamadas células de Paneth que estão localizadas nas criptas do intestino delgado e que expressam α -defensinas, que são peptídeos antimicrobianos e se ligam em microrganismos, incluindo os que fazem parte da microbiota residente e ajudam a modular a composição da microbiota intestinal (BEVINS CL, SALZMAN NH, 2011). No intestino também há a presença de células M que são células epiteliais especializadas que ficam sobrepostas aos tecidos linfóides, como as placas de Peyer, e facilitam amostragem de antígenos. As células dendríticas (DCs) levam antígenos das células M até as placas de Peyer ou diretamente no lúmen através de projeções do corpo celular que penetram na camada epitelial (MARANDUBA CM, *et al.* 2015).

Também no intestino ocorre a produção de IgA secretada (SIgA) por células plasmáticas localizadas nas placas de Peyer, que após ser produzida é secretada através do epitélio no lúmen intestinal por transcitose. A maior parte da IgA produzida ocorre após ativação de receptores do tipo Toll (TLR) nas células T e células B por antígenos microbianos e se liga com baixa afinidade a uma ampla fração de microrganismos intestinais, impedindo sua translocação através do epitélio (JEFFREY J. *et al*, 2018). As respostas dependentes de células T auxiliares foliculares (TFH) contribuem também para a homeostase, apoiando a produção de IgA de alta afinidade, que parece estar envolvida na ligação a bactérias selecionadas. Outro fator importante para a tolerância do hospedeiro a microbiota intestinal é a produção de citocinas derivadas de células mielóides, incluindo IL-1 β , IL-6 e IL-23 que promovem a diferenciação de células auxiliares T 17 (Th17). A IL-22 produzida por células Th17 reforça a segregação de simbiontes, induzindo a expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (SHAW MH, *et al*. 2012). E se eventualmente as bactérias são capazes de superar essas barreiras, os neutrófilos estimulados por IL-17 podem eliminar os patobiontes localizados próximo à superfície epitelial apical ou que atingiram a lâmina própria (SABAT R, *et al*. 2014; ATARASHI K, 2015; KAMADA N & NÚÑEZ G, 2014). Além disso, a produção de IgG específica para bactérias controla infecção sistêmica por ligar-se a microrganismos patobiontes, promovendo a opsonização. Além do mais, microrganismos penetrantes são fagocitados pelas células de Kupffer no fígado e macrófagos esplênicos para controle da disseminação sistêmica (SMITH, K., *et al*. 2007).

Assim, a exposição à microbiota, no intestino é minimizada pela produção de muco pelas células caliciformes e secreção de IgA. Além disso, o reconhecimento de microrganismos simbióticos promove a ativação de vias anti-inflamatórias nas placas de Peyer e na lâmina própria intestinal, com aumento da síntese de IL-10, TGF- β , ácido retinóico e da população de células T reguladoras (KLEBANOFF CA, 2013).

Por outro lado, o contato com os antígenos microbianos é essencial para o desenvolvimento e a maturação do sistema imune do hospedeiro (ARTIS D, 2008). O desenvolvimento dos tecidos linfóides associados ao intestino (GALTs), a secreção de IgA e a ativação de células T na mucosa intestinal são dependentes de estímulos derivados da microbiota (HOOPER, L. V. & MACPHERSON AJ, 2010). Em animais isentos de germes (GF), é observada alteração na estrutura das placas de Peyer e na população de células T e B na lâmina própria. É observado menor desenvolvimento das zonas de células T e B no baço e nos nódulos linfóides dos animais GF (SMITH, K., *et al*, 2007). A colonização intestinal também estimula a produção de IgG (

ZENG MY, *et al.* 2016) e IgA, a diferenciação das células Th1, Th2 e Th17 e T reguladoras (ROUND, J. L. & MAZMANIAN S K, 2009). Em conjunto, a microbiota modula o balanço entre o papel efetor e regulador do sistema imune inato e adaptativo. Um exemplo a ser citado aqui são as bactérias simbióticas, que promovem imunidade protetora por reforçar a barreira da mucosa limitando a penetração de microrganismos simbiotes enquanto controla respostas das células T de forma exacerbada a microrganismos. O rompimento dessa interação mutualista hospedeiro-simbionte pode promover respostas imunes inapropriadas, inclusive contra uma microbiota disbiótica em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (CARUSO R, LO BC, NÚÑEZ G, 2020).

A microbiota intestinal serve como um órgão auxiliar do corpo, ligando o trato gastrointestinal ao ambiente externo. A interação da microbiota com o hospedeiro através da camada de muco ou por mecanismos específicos de amostragem, como as células dendríticas subepiteliais e células M, estabelecem um sistema codependente que determina um estado de homeostase ou de doença. Alterações na composição ou atividade de membros da microbiota intestinal, referidos como disbiose, podem causar o rompimento da barreira mucosa intestinal ou levar a uma atividade desregulada do sistema imune, podendo favorecer o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (IBD) (MEHTA M, AHMED S, DRYDEN G, 2013; BROWN, E. M., M. SADARANGANI, B. FINLAY, 2013).

DISBIOSE E COLITE ULCERATIVA

A perda da homeostase intestinal é um fator que contribui para a disbiose, onde a diversidade e a estabilidade da microbiota são comprometidas. A disbiose é geralmente caracterizada por uma redução de diversidade e perda significativa de bactérias pertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroidetes e um aumento de representantes do filo das Proteobacterias (LITVAK Y, *et al.*,2017). O filo Proteobactéria é subdividido nas classes Alpha-Proteobacteria, Beta-Proteobacteria, Gamma-proteobacteria, Delta-Proteobacteria e Epsilon-proteobacteria. A classe Gamma-proteobacteria é a maior e mais diversificada classe de Proteobacteria, abrigando a metade das espécies conhecidas desse filo, contendo aproximadamente 1.500 espécies caracterizadas, distribuídas em 15 ordens, com destaque para a ordem Enterobacteriales. A família *Enterobacteriaceae*, chamada comumente de bactérias entéricas (MILANI 2016), é composta por bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos,

anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose e oxidase-negativo, com alguns representantes apresentando motilidade por flagelação peritríquia (MADIGAN, M T. *et al*, 2016). Os membros dessa família são ubíquos, distribuídos amplamente na natureza. Embora muitas espécies existam como parte da microbiota comensal de animais e humanos, alguns desses membros podem vir a causar infecções oportunistas.

A disbiose frequentemente pode resultar em um rápido aumento de bactérias nocivas no intestino. Além disso, a liberação de enterotoxinas por essas bactérias aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal (SHEN ZH, *et al*. 2018). Essas bactérias, chamadas patobiontes, podem invadir e danificar as células epiteliais intestinais, resultando em danos à barreira da mucosa intestinal. Quando a função de proteção da parede intestinal diminui, pode ocorrer a translocação da microbiota, o que potencializa o dano a barreira da mucosa intestinal, agravando a resposta inflamatória intestinal. Geralmente essas infecções intestinais resultam em uma inflamação intestinal exacerbada. Essa inflamação intestinal é, na maioria das vezes, diagnosticada como doença inflamatória intestinal, muitas vezes abreviado como IBD (do inglês, *Inflammatory Bowel Diseases*). As IBDs incluem a doença de Crohn e a colite ulcerativa, sendo ambas doenças inflamatórias e crônicas que afetam aproximadamente 3 milhões de pessoas nos Estados Unidos (ARTIS D, 2008).

A colite ulcerativa (UC – do inglês, *ulcerative colitis*) é uma doença inflamatória crônica que afeta o cólon. A etiologia e patogênese da colite são complexas, multifatoriais e envolvem fatores genéticos (MCGOVERN DP, *et al*. 2015) e ambientais (SHEEHAN D & SHANAHAN F, 2017). É uma doença que atinge tanto homens quanto mulheres, sendo sua incidência similar tanto em crianças quanto adultos (SHAH SC, 2018). A maior incidência e prevalência de Colite ulcerativa foi relatado na Europa e América do Norte, entre 1990 e 2016, com prevalência excedendo 0,3% da população geral em muitos países. No entanto, a incidência e prevalência de Colite está aumentando constantemente nas regiões em desenvolvimento, onde as culturas se tornaram mais ocidentalizadas, como a América Latina (NG SC, *et al*. 2017).

Como já mencionado anteriormente, a causa da colite ulcerativa pode ser genética, e alguns estudos genéticos já conseguiram identificar mais de 200 loci que são capazes de regular o risco para o desenvolvimento de Doenças inflamatórias intestinais, sendo que a maioria desses loci estão associados com vias imunológicas que regulam o reconhecimento e morte de microrganismos (ATARASHI K, 2015; LIU JZ, *et al*. 2015). Os sintomas da Colite incluem diarreia, presença de sangue nas fezes, fadiga, febre e intensa dor abdominal. Muitas evidências

apontam para o envolvimento da microbiota intestinal na patogênese da UC, com antígenos bacterianos provenientes do lúmen intestinal contribuindo para a ativação de células imunes.

A microbiota intestinal de pacientes diagnosticados com colite ulcerativa é menos diversa quando comparada à microbiota de indivíduos saudáveis (CLEYNEN I, 2016). Essa perda de diversidade é frequentemente caracterizada em humanos por uma diminuição de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes, especialmente membros dos clusters de *Clostridium* IV e XIV, enquanto ocorre um aumento relativo da abundância de representantes do grupo das Proteobacteria, principalmente da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*, que geralmente é subdominante na microbiota intestinal de pessoas saudáveis (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ M, 2013).

Durante a colite ulcerativa, ocorre também o aumento da permeabilidade da mucosa, com intenso infiltrado inflamatório e com redução do número de células caliciformes e, conseqüentemente, redução da produção de mucina, facilitando a invasão do tecido intestinal por microrganismos pertencentes à microbiota (ACTIS GC & PELLICANO R. 2016). Em condições de homeostase, a imunidade inata do hospedeiro impede a invasão de bactérias patogênicas e apresenta tolerância à microbiota indígena (ZHANG YJ, *et al.* 2015). Achados experimentais demonstram que a microbiota intestinal alterada tem papel importante no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Assim, o controle da disbiose da microbiota intestinal durante a colite ulcerativa pode ser importante no controle das manifestações patológicas dessa condição clínica (KNIGHTS D, *et al.* 2013).

OXIDO NÍTRICO E COLITE ULCERATIVA

Óxido nítrico, do inglês, *nitric oxide* (NO), é uma molécula inorgânica essencial envolvida em vários eventos fisiológicos e patológicos. NO é um radical livre gasoso que é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina (L-Arg) em uma reação catalisada pelo grupo de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Uma quantidade de NOS, como NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), também chamado de NOS constitutivos, são minimamente expressas dentro de locais inflamados. Contudo, NOS induzível (iNOS) é altamente expresso em células inflamatórias em resposta a estímulos imunogênicos. Obviamente, uma quantidade adequada desta resposta imune no intestino é necessária para proteção contra infecções, mas a produção excessiva de NO pode exercer efeitos patológicos (KAMALIAN A, *et al.* 2020).

O NO é uma molécula mensageira que possui funções regulatórias intra e extracelulares para muitas células. No trato gastrointestinal, as isoformas constitutivas encontradas nas células endoteliais (eNOS) e em certos terminais nervosos (nNOS) que inervam o cólon, regulam o fluxo sanguíneo e a motilidade intestinal, promovendo o relaxamento muscular dos vasos e do intestino, respectivamente (KOLIOS G, *et al.*2004). A terceira isoforma induzível (iNOS) é altamente expressa em macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e de músculo liso sob diferentes estímulos. Após a indução por endotoxina e / ou citocinas, iNOS gera níveis elevados de NO. Esses níveis elevados de NO podem ser tóxicos e podem danificar o tecido saudável. A lesão tecidual pode resultar de uma interação de NO com ânion superóxido, uma das espécies reativas de oxigênio, resultando na formação de peroxinitrito que contribui ainda mais para o dano tecidual e aumento da resposta inflamatória (PALATKA K, *et al.*2005).

Como dito anteriormente, a colite ulcerativa é uma doença inflamatória idiopática, crônica e remittente do trato gastrointestinal que apesar de inúmeras pesquisas a etiologia e patogênese permanece desconhecida. Muitos estudos experimentais e clínicos sugerem que o início e a patogênese da colite sejam multifatoriais envolvendo a interação entre fatores genéticos, ambientais, infecciosos e imunológicos. Vários mediadores têm sido sugeridos como possíveis participantes na patogênese da resposta inflamatória. O óxido nítrico é um dos possíveis fatores etiológicos propostos no processo inflamatório dessas doenças. Sinais de colite como vasodilatação na mucosa, aumento da permeabilidade vascular e epitelial e distúrbios de motilidade estão relacionados com efeitos diretos ou indiretos do NO. Há evidências abrangentes de um aumento na produção de NO nas IBDs (LJUNG T, *et al.* 2006). Resultados de estudos apoiam a hipótese de que o NO é um importante fator etiológico para o desenvolvimento de doença inflamatória crônica do intestino e colite ulcerativa pelo fato de em vários estudos encontrar concentrações aumentadas de NO e superexpressão de iNOS na mucosa de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII), o que pode contribuir para o processo de deterioração e exacerbação das respostas imunes (AVDAGIĆ N, *et al.* 2013).

iNOS é inicialmente ativada por citocinas pró-inflamatórias e estímulos imunogênicos, agindo por meio das vias de sinalização JAK /STAT. Ativação de iNOS e produção irregular de NO por citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, TNF, IFN- γ , IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 ou IL-23) ou por lipopolissacarídeos (LPS), resulta em maior propagação de respostas inflamatórias através da ativação de neutrófilos, células NK e macrófagos (RAAT NJH, *et al.* 2009; TISO M & SCHECHTER AN. 2015).

A própria inflamação causada pela colite e a disbiose em primeiro momento promove a migração para o cólon de neutrófilos que chegam ao tecido lesado para fazer o reparo. Embora os neutrófilos sejam muito importantes para o reparo, eles também trazem consequências para o hospedeiro como, por exemplo, a liberação de conteúdos tóxicos dos seus grânulos, como espécies de radicais reativos e proteases. Esses produtos são altamente potentes e não discriminam entre alvos microbianos e células lesadas ou outras células do hospedeiro. Dessa forma, o dano ao tecido do hospedeiro é muitas vezes inevitável (PORTER RJ, *et al.* 2020).

Assim, um componente importante da resposta inflamatória do hospedeiro durante a colite é a geração de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Por exemplo, iNOS é expresso em níveis elevados durante a inflamação intestinal e concentrações elevadas de óxido nítrico (NO) são detectadas no lúmen do colon de indivíduos com doença inflamatória intestinal (SINGER II, *et al.* 1996). A reação de radicais de óxido nítrico (NO.) com radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produz peroxinitrito ($ONOO^-$), que pode gerar nitrato (NO_3^-) ou oxidar sulfetos orgânicos e aminas terciárias em S-óxidos e N-óxidos (BALAGAM B & RICHARDSON DE. 2008). Da mesma forma, derivados de ROS da inflamação podem gerar S-óxidos e N-óxidos (PANDA S & DING JL. 2015). Ao contrário dos membros anaeróbicos obrigatórios da microbiota intestinal, as *Enterobacteriaceae* anaeróbicas facultativas podem usar nitrato, S-óxidos e N-óxidos como aceptores terminais de elétrons para respiração anaeróbica (WINTER SE, *et al.* 2013). Assim, a produção de NO exacerbada na colite pode contribuir para a geração de moléculas que favoreçam a expansão da população de bactérias da família *Enterobacteriaceae* em detrimento de outras bactérias que compõem a microbiota intestinal indígena.

IMUNOGLOBULINAS E A MICROBIOTA INTESTINAL

A enorme exposição a antígenos exógenos que ocorre no lúmen intestinal obriga o sistema imune do hospedeiro a regular suas respostas para manter a relação simbiótica com bactérias comensais. Bactérias comensais transmitem um sinal que induz uma resposta de tolerância do hospedeiro. Assim, o sistema imune do hospedeiro pode discriminar entre microrganismos comensais e potenciais patógenos. Para prevenir uma resposta inflamatória contra bactérias comensais, macrófagos, células dendríticas e células T $CD4^+$ são hiporresponsivas à

estimulação microbiana (CLEMENTE JC, *et al.* 2012). No entanto, durante a inflamação intestinal decorrente de doenças inflamatórias intestinais, há exposição de novos antígenos ao sistema imune (HAND TW, *et al.* 2012).

Dentre os vários componentes do sistema imune, podemos destacar as imunoglobulinas, ou anticorpos, quando na sua forma solúvel, que contribuem para a imunidade de três maneiras principais: neutralização, opsonização e ativação da via clássica do complemento. Os anticorpos protegem contra patógenos extracelulares e suas toxinas. As moléculas de anticorpos possuem forma de “Y” e consistem em três segmentos de mesmo tamanho que são conectados por uma porção flexível onde as extremidades dos braços formam dois sítios de ligações antigênicas, denominados porção Fab. As regiões Fab são variáveis de uma molécula para outra, fornecendo a diversidade necessária ao reconhecimento do antígeno de maneira específica. A haste do Y denominada como porção Fc é muito menos variável. Existem 5 classes de isotipos de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgM e IgG) e cada região constante determina as propriedades funcionais de cada molécula (MURPHY, K, *et al.* 2014).

Nas células B, a imunoglobulina de superfície serve como receptor de célula B (BCR) para um determinado antígeno. A imunoglobulina de superfície tem a capacidade de se ligar a proteínas nativas, glicoproteínas e polissacarídeos e células bacterianas através do reconhecimento de epítopos na sua superfície. O BCR promove o carregamento do antígeno ligado para sítios intracelulares, onde serão degradados para originar peptídeos que são ligadas a uma molécula de MHC de classe II e expostas na membrana na célula B. Essas moléculas de MHC-II com o antígeno serão reconhecidas por células T auxiliares específicas para o antígeno, que já se diferenciaram em resposta ao mesmo patógeno. As células T, ao entrarem em contato com a célula B e com uma molécula coestimuladora, produzem citocinas que fazem as células B proliferarem e diferenciarem-se em células secretoras de anticorpos ou células B de memória. (PANDA S & DING JL. 2015).

Além desses anticorpos específicos para antígenos, os anticorpos naturais, que são produzidos após o nascimento em recém-nascidos e em adultos antes de infecção, colaboram com o sistema imune inato, combatendo patógenos e facilitando a resposta imune adaptativa, ao aprisionar o patógeno nos órgãos linfoides (ROSADO MM, *et al.* 2009). A característica desses anticorpos, que os torna tão eficientes, é a sua promiscuidade. A capacidade de ligar vários antígenos garante proteção contra vários antígenos estranhos. E sem esse mecanismo de proteção, raramente sobreviveríamos tempo suficiente para ativar mecanismos de defesa mais sofisticados,

como representados pela alta afinidade de anticorpos produzidos pela resposta imune adaptativa (HARRIS NL, *et al.*2006).

Em mamíferos a imunoglobulina IgA é o principal isotipo de anticorpo encontrado no intestino delgado, onde as suas principais funções são a neutralização de antígenos e toxinas e patógenos, bloqueando a adesão e a translocação dos mesmos (LYCKE NY & BEMARK M. 2017). A IgA é transportada para o lúmen intestinal via transportador de imunoglobulinas poliméricas (pIgR), e na ausência desse transportador há uma maior produção de peptídeos antimicrobianos (TURULA H & WOBUS CE. 2018). As imunoglobulinas A secretadas (SIgA) do trato gastrointestinal são polireativas contra várias espécies bacterianas e têm como alvo principal as bactérias comensais intestinais (BUNKER JJ, *et al.* 2017). A maior parte dessas imunoglobulinas naturais anti-comensais é produzida através de respostas de células B independentes de células T (MACPHERSON AJ, *et al.* 2000). Porém, a produção de 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 (MCCOY KD, *et al.* 2017). A IgA inclusive pode participar no processo de identificação de potenciais microrganismos responsáveis por causar doenças inflamatórias intestinais, visto que um trabalho publicado na revista Cell em 2015, demonstrou que ao se eliminar microrganismos que estavam revestidos com IgA ocorria a reversão do fenótipo da doença em animais isentos de germes (NOAH W. *et al.* 2015).

Os anticorpos IgG, foco desse trabalho, são moléculas grandes com peso molecular de 150 kDa, e em relação à sua estrutura molecular, 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 em 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"). Em toda imunoglobulina as duas cadeias pesadas e as duas cadeias leves são

idênticas, o que possibilita para o anticorpo ligar de forma simultânea a dois antígenos idênticos e aumentar a interação. Essa força de interação da molécula de anticorpo é denominada avidéz (ZENG MY, *et al.* 2016).

Durante infecções patogênicas, uma das primeiras funções do anticorpo é a neutralização do patógeno, evitando a adesão dele aos tecidos e células hospedeiras. Porém, essa ligação pelos anticorpos muitas vezes não é suficiente para impedir a replicação do patógeno. No caso de falha da neutralização, a função dos anticorpos é de permitir a opsonização, “marcando” esse patógeno ou qualquer outro produto derivado dele para permitir a fagocitose por neutrófilos e macrófagos. A terceira função do anticorpo é a ativação do sistema complemento. O complemento é inicialmente ativado na imunidade inata por superfícies bacterianas, sem o auxílio de anticorpos. Porém, quando um anticorpo se liga a superfície bacteriana, suas regiões constantes fornecem a plataforma para ativar a primeira proteína de uma das vias do sistema do complemento. Os componentes do sistema complemento que são depositados na superfície do patógeno podem destruir diretamente alguns, ou esse revestimento feito pelos anticorpos e complemento permitem a fagocitose e a destruição do patógeno, que de outra forma não seriam reconhecidos. O complemento intensifica as ações bactericidas dos fagócitos e é assim chamado porque complementa a atividade dos anticorpos (KLEBANOFF CA, 2013).

Os anticorpos se ligam especificamente aos antígenos e, assim, geram complexos imunes, mas a ligação por si só não faz nada ou faz muito pouco ao antígeno. De fato, foi descoberto recentemente que tanto a neutralização do patógeno quanto a neutralização de toxinas bacterianas, que há muito são exemplos paradigmáticos das propriedades biológicas dos anticorpos devido ao mascaramento de locais específicos em antígenos, requerem mais do que ligação. Eles requerem a porção Fc de anticorpos e dependem de receptores para anticorpos (JOLLER N, *et al.* 2010). Para que os anticorpos afetem os antígenos, eles realmente precisam não apenas se ligar aos epítomos do antígeno por meio de suas porções Fab, mas também interagir por meio de sua porção Fc com os sistemas efetores. Estes incluem moléculas solúveis, como componentes da cascata enzimática do Complemento e células que expressam receptores para a porção Fc dos anticorpos (FcRs) (DAËRON M. 2014).

Os Fc γ Rs são glicoproteínas de membrana do tipo I, sendo receptores para o fragmento cristalino dos anticorpos IgGs. Os Fc γ Rs são normalmente categorizados em dois tipos: receptores Fc γ R do tipo I e do tipo II. Os receptores Fc γ R de tipo I incluem os receptores canônicos que incluem os receptores Fc γ RIII e Fc γ RIIB e podem ser ativados pela porção Fc apenas na conformação aberta. Por outro lado, os Fc γ R 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 S & RAVETCH JV.2017). Os receptores Fc γ R do tipo I, estudados durante a realização desse trabalho, exercem uma série de funções pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, após serem ativados pela IgG, fazendo com que esses receptores exerçam um papel central na regulação do sistema imune (KAIFU T & NAKAMURA A. 2017). Os receptores Fc γ são expressos em todas as células mieloides do sistema hematopoiético, como por exemplo, células efetoras imunes inatas (neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dendríticas, basófilos e mastócitos), que apresentam em sua superfície tanto Fc γ Rs de ativação quanto de inibição.

Os receptores Fc γ do tipo I são classificados 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: Fc γ RI, Fc γ RIII, Fc γ RIV, um receptor de inibição Fc γ RIIB e um receptor FcRn envolvido no transporte de IgG. Já em humanos, são descritos 7 diferentes tipos de Fc γ Rs (Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ IIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB e Fc γ Rn) (BEN MKADDEM S, *et al.* 2019).

O receptor Fc γ RIII é um receptor de ativação de baixa afinidade para as subclasses de IgG: IgG1, IgG2a e IgG2b e também possui um papel chave na resposta inflamatória de várias doenças autoimunes (NIMMERJAHN F. & RAVETCH JV. 2008). Receptores Fc γ RIII possuem acoplado a eles uma subunidade adaptadora contendo motivos ITAM (imunorreceptor de ativação baseado em tirosina). A ativação desse receptor irá resultar na ativação de respostas imunes como por exemplo, liberação de citocinas (BOURNAZOS S, RAVETCH JV. 2015). Já 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, ele é o único encontrado nas células B, onde exerce uma função muito importante na tolerância das células B, regulando a produção de autoanticorpos (BOURNAZOS S, RAVETCH JV. 2015). O Fc γ RIIB também é encontrado nas células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, macrófagos e basófilos. Nestas células, o receptor Fc γ RIIB exerce a função de inibir as funções dos Fc γ Rs de ativação, como inibição da fagocitose e liberação de citocinas pró-inflamatórias (NIMMERJAHN F. & RAVETCH JV. 2008).

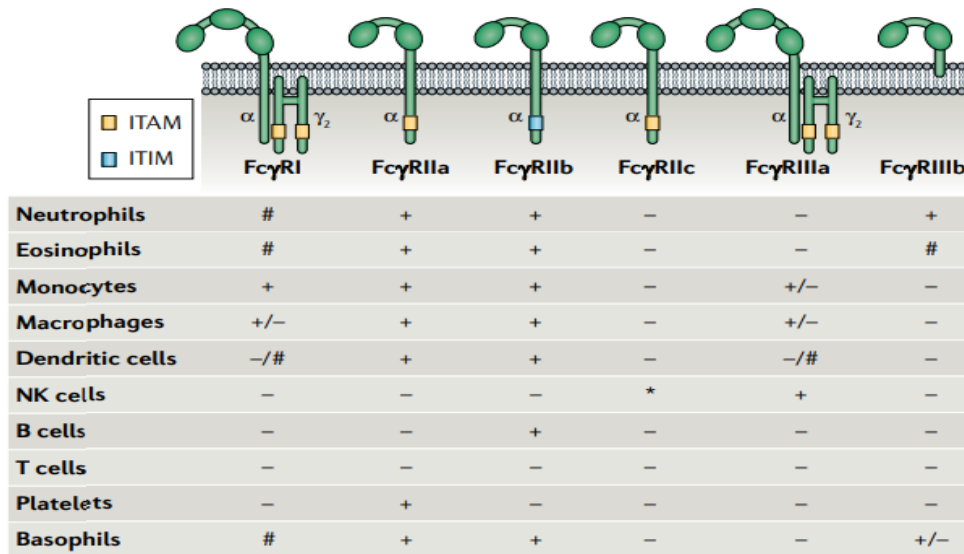


Figura 3: Visão geral da família dos receptores Fcγ e padrões de expressão entre leucócitos efetores humanos. Receptores Fcγ tipo I canônicos (FcγRs) são amplamente categorizados em ativadores ou inibitório com base na presença de motivo (ITAM) imunorreceptor de ativação de tirosina ou do motivo (ITIM) imunorreceptor inibidor de tirosina em seus domínios intracelulares. A maioria dos leucócitos efetores co-expressa combinações de receptores de ativações e inibições e suas atividades de sinalização opostas determinam o resultado inflamatório mediado por IgG. Embora os FcγRs sejam expressos abundantemente entre os vários subconjuntos de leucócitos, mediadores inflamatórios e status de diferenciação modulam a expressão do vários FcγRs, alterando assim a capacidade de resposta dos leucócitos efetores mediados por sinalização de IgG. +, expressão constitutiva; -, nenhuma expressão; #, expressão induzível; *, expressão depende do status alélico FCGR2C; NK, Natural Killer. Imagem acima adaptada de (BOURNAZOS S, *et al.* 2020).

Todavia, 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, sendo 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 (CISALPINO D, *et al.* 2017). De fato, 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. Nesse trabalho, os pesquisadores demonstraram, através de análise de citometria de fluxo, que uma proporção maior das bactérias fecais dos animais submetidos a colite se apresentava revestida por IgG quando comparado às bactérias fecais do grupo controle. 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. Nesse

mesmo trabalho, os autores também identificaram que a Lipoproteína mureína (MLP), uma proteína de membrana externa altamente conservada em enterobactérias, é o principal alvo de reconhecimento por essa IgG (SAULNIER, 2013).

Em um outro estudo publicado em janeiro de 2019, utilizando também a técnica de citometria de fluxo para entender possíveis interações de microrganismos comensais do hospedeiro durante inflamações intestinais, foi demonstrado que pacientes com doenças inflamatórias intestinais tem respostas imunes adaptativas aumentadas e direcionadas contra bactérias comensais. Os autores demonstraram isso pelo aumento das frequências de bactérias ligadas com IgA e IgG em comparação com indivíduos saudáveis, ou seja, sem doenças inflamatórias intestinais. Em segundo lugar, a porcentagem de bactérias fecais ligadas por imunoglobulinas estava diretamente correlacionada com a atividade da doença inflamatória intestinal, embora a frequência de ligação com IgA se correlacione apenas com a atividade da doença de Crohn, e não com a colite ulcerativa. E por fim os autores mostraram que táxons específicos, como *Streptococcus*, apresentam aumento do direcionamento de imunoglobulinas em pacientes com doenças inflamatórias em comparação com pacientes sem DII e estão correlacionados com a extensão da resposta de imunoglobulinas, demonstrando assim que a tolerância imunológica da mucosa às bactérias comensais é alterada em pacientes com DII, sugerindo, inclusive, que a análise de citometria de fluxo de bactérias fecais tem utilidade potencial para auxiliar no manejo das DII. E como conclusão nesse estudo, os autores também sugerem que bactérias ligadas por IgG podem, inclusive ser usada como biomarcadores da colite ulcerativa. Os autores reforçam ainda a ideia de que, notavelmente, a presença de bactérias ligadas a IgG está fortemente associada à percepção do paciente de exacerbação da doença, particularmente na colite, e pode ser útil em pacientes que sub-relatam atividade da doença (RENGARAJAN, S., *et al.* 2019).

Outro trabalho publicado em 2015 demonstrou que há indução de anticorpos contra fatores de virulência da bactéria *Citrobacter rodentium*, que é considerada um patógeno entérico em camundongos, e que essa resposta é importante para a remoção do patógeno. Essa resposta foi dependente de receptores Fc, pois na ausência desses receptores os camundongos foram mais susceptíveis à infecção (KAMADA N, *et al.* 2015). De forma semelhante, nosso grupo demonstrou que IgG induzidas pela microbiota são importantes para a resposta 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 (HOOPER, L. V. & MACPHERSON AJ, 2010). A IgG

induzida pela microbiota parece promover a inflamação durante a isquemia e reperfusão intestinal via ativação de receptores Fc γ RIII, como demonstrado por (BRITO BC. 2018).

Em conjunto, esses trabalhos demonstram que IgGs induzidas pela microbiota atingem o lúmen durante uma lesão intestinal e induzem uma resposta anti-microbiana dependente, em parte, da ativação de receptores de IgG. Embora já seja bem estabelecido o papel de IgG no controle de infecções intestinais bem como o papel de IgA no controle da composição da microbiota intestinal, pouco se sabe se IgG também poderia desempenhar um papel no controle da atividade ou composição da microbiota intestinal indígena. Mais especificamente, não é conhecido se IgG estaria envolvida no controle da disbiose da microbiota intestinal durante doenças inflamatórias intestinais. Diante disso, nosso objetivo nesse trabalho é avaliar qual o papel de da IgG no controle e resolução da disbiose intestinal em modelo de colite ulcerativa em camundongos.

JUSTIFICATIVA:

Já está bem estabelecida na literatura a importância da microbiota intestinal para a saúde do hospedeiro: a colonização intestinal com bactérias simbióticas leva à proteção do hospedeiro contra patógenos, tanto pela competição por espaço e nutrientes, quanto pela inibição de crescimento desses patógenos por produção de peptídeos antimicrobianos. Assim, uma microbiota em equilíbrio traz muitos benefícios para o hospedeiro. Em contrapartida, a perturbação dessa homeostase, caracterizado como disbiose, está relacionado com doenças inflamatórias intestinais. Dentre as doenças inflamatórias intestinais, uma das principais representantes é a colite ulcerativa.

Tem sido registrado um aumento da incidência e prevalência da UC em diferentes regiões do mundo. Os sintomas da Colite ulcerativa incluem dor abdominal, diarreia, presença de sangue nas fezes, fadiga, febre e perda de peso. Esses episódios geralmente são alternados com períodos de remissão, mas a colite é uma doença que permanece ao longo da vida com um grande efeito na redução da qualidade de vida (NG SC, *et al.* 2017).

A disbiose e inflamação causada pela colite levam a exposição de novos antígenos ao sistema imune. Muitos estudos focam no papel da IgA na proteção e resolução de doenças inflamatórias intestinais, justamente por ser a imunoglobulina predominante na mucosa intestinal. De fato, muitos estudos já demonstraram a importância da IgA na manutenção da homeostase intestinal e até mesmo no controle da composição da microbiota intestinal. Porém pouco se tem descrito na literatura sobre um eventual papel da IgG nessas circunstâncias. Alguns estudos, inclusive do nosso grupo, têm demonstrado que parte das IgGs circulantes são também induzidas pela microbiota e podem estar envolvidas no desencadeamento da inflamação intestinal (CISALPINO D, *et al.* 2017). Outros trabalhos demonstram que IgGs controlam a expansão de patógenos intestinais no lúmen do cólon bem como a translocação bacteriana do lúmen do cólon para a circulação. Esses trabalhos sugerem que durante eventos inflamatórios, IgGs podem estar envolvidas no controle da homeostase microbiana intestinal. Inclusive, em um desses trabalhos, os autores demonstraram que há indução de IgG contra uma proteína de membrana de bactérias Gram negativas simbióticas (KAMADA N, *et al.* 2015). Assim, propomos que antígenos provenientes da microbiota em disbiose são expostos ao sistema imune do hospedeiro e que as IgGs induzidas pela microbiota intestinal disbiótica desencadeariam uma resposta mediada por receptores Fc γ presentes em leucócitos que seria

importante para a resolução da disbiose associada à colite ulcerativa, favorecendo o restabelecimento da homeostase intestinal, e controlando a composição da microbiota. O presente projeto visa testar essa hipótese, utilizando-se de um modelo murino de colite ulcerativa bastante conhecido e os conhecimentos gerados por esse estudo podem sugerir novos alvos de potencial terapêutico para o controle da homeostase microbiana durante essa importante condição clínica.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GERAL:

Entender se imunoglobulinas G induzidas pela microbiota intestinal desempenham papel no controle da composição e/ou da atividade da microbiota intestinal após disbiose induzida pela administração de DSS em camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar se IgG circulante induzida pela microbiota é mais ávida por antígenos provenientes da microbiota disbiótica.
2. Caracterizar temporalmente a disbiose associada à colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos.
3. Caracterizar temporalmente o curso da doença, da resposta inflamatória e da lesão tecidual associada à colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos.
4. Caracterizar temporalmente os níveis de IgG luminal e sérico, bem como seus alvos bacterianos, durante o curso da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos.
5. Avaliar se tratamento com coquetel de antimicrobianos interfere na concentração de IgG luminal, bem como na sua ligação a alvos disbióticos durante o curso da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos.
6. Avaliar se animais $MuT^{-/-}$ têm alteração no controle da disbiose durante a colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos.
7. Avaliar se o tratamento com antimicrobianos após o início da colite reverte ou interfere na susceptibilidade de animais $MuT^{-/-}$ a colite ulcerativa.
8. Avaliar se a injeção de IgG purificada do soro de animais selvagens em animais $MuT^{-/-}$ interfere no controle da disbiose associada à colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos.
9. Avaliar se animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ têm alteração no controle da disbiose durante a colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos.

10. Avaliar se o tratamento com antimicrobianos após o início da colite reverte ou interfere na susceptibilidade dos animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ a colite
11. Avaliar se há alteração da expressão de NOS2 no cólon inflamado de animais $MuT^{-/-}$, $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$.
12. Avaliar o efeito do tratamento com aminoguanidina no controle da disbiose e na susceptibilidade à colite ulcerativa em animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$.

METODOLOGIA:

ANIMAIS E EUTANÁSIA:

Foram utilizadas as seguintes linhagens de camundongos: (I) camundongos convencionais C57/BL6 fêmeas de 6-8 semanas oriundos do Biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais; mantidos no biotério do laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG. (II) Camundongos geneticamente deficientes na cadeia MuT (MuT^{-/-}) e, portanto, deficientes em linfócitos B; (III) camundongos geneticamente deficientes dos receptores FcγRIIB e (IV) camundongos geneticamente deficientes dos receptores FcγRIII, fêmeas de 6-8 semanas, todos obtidos do biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. (V) Animais isentos de microbiota (GF) da linhagem NIH/Swiss mantidos no Biotério de Gnotobiologia do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.

Os animais com microbiota convencional foram transferidos para microisoladores (Alesco) contendo maravalha autoclavada e alocados em estantes de ventilação individual e mantidos sob temperatura controlada (23°C), ciclos de iluminação de 12 horas e com livre acesso à ração e água filtrada autoclavada. Os animais gnotobióticos foram mantidos em microisoladores vedados com lã de vidro previamente autoclavados e mantidos sob temperatura controlada (23°C), ciclos de iluminação de 12 horas e com livre acesso à ração autoclavada e água filtrada também autoclavada.

Para eutanásia, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80mg/kg) e xilasina (15mg/kg) em tampão fosfato (PBS, 100 mL de volume final) pela via intra-peritoneal e então submetidos a sangria pelo plexo braquial. Todos os procedimentos experimentais deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG-Protocolos CEUA 173/2017 e 258/2020.

CONVENCIONALIZAÇÃO DE ANIMAIS ISENTOS DE MICROBIOTA

Para reposição da microbiota, animais isentos de germes receberam a administração de fezes oriundas de animais convencionais pela via oral de acordo com protocolo previamente descrito por Souza e colaboradores (2004). As fezes, retiradas da região retal de animais convencionais foram homogeneizadas na proporção de 10% p/v em solução salina de NaCl 0,9% p/v e foram administrados um volume de 100 µL por gavagem. Após 14 dias, a colonização pela microbiota

foi verificada em meio tioglicolato e BHI, e esses animais foram submetidos à eutanásia conforme descrito anteriormente.

INDUÇÃO DA COLITE:

Para indução da colite na primeira etapa do trabalho foi utilizado sulfato de sódio dextrana (DSS) na concentração de 2% (p/v) em água de beber durante 9 dias. A partir do 10º dia experimental, a solução de DSS 2% foi trocada por água filtrada autoclavada.²² Na segunda etapa do trabalho foi utilizado sulfato de sódio dextrana (DSS) na concentração de 2,5% (p/v) em água de beber durante 8 dias.

TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANOS, AMINOGUANIDINA E COM IgG PURIFICADO:

Os animais foram expostos a um coquetel de antibióticos consistindo de vancomicina (0,5 g/L), metronidazol (1 g/L) e ciprofloxacino (0,2 g/L) diluídos na solução de DSS 2,5% p/v a partir do quinto dia de administração de DSS, até o nono dia do protocolo experimental. Após esse período, a solução foi substituída por outra contendo apenas os antimicrobianos diluídos nas mesmas concentrações descritas anteriormente em água de beber filtrada e autoclavada. Os animais foram mantidos com acesso ao referido coquetel de antibióticos até a eutanásia.

Animais $MuT^{-/-}$ submetidos a colite com DSS 2,5% p/v, nos dias 3, 5 e 7 receberam 1 mg de IgG previamente purificados diluído em PBS por via intraperitoneal.

Os animais foram tratados com aminoguanidina (AG) na concentração de 1 mg/ml adicionada a solução de DSS 2,5% p/v a partir do terceiro dia do protocolo experimental, até o oitavo dia do protocolo experimental.

DETERMINAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO

Os camundongos foram monitorados e pesados inicialmente e então a cada dois dias. Os animais foram colocados isolados em uma gaiola por 10 minutos para obtenção e determinação da consistência das fezes. A presença de sangue nas fezes foi avaliada por meio do teste de papel guáiacó Feca-Cult (INLAB, São Paulo, Brasil). A graduação encontra-se a seguir de acordo com os seguintes itens: Consistência das fezes; 0 = fezes normais; 1= fezes pastosas; 2= fezes líquidas; Presença de sangue nas fezes; 0=ausente;1= traços de sangue; 2=presença de sangue; Perda de peso corporal; 0=perda de até 5% do peso inicial; 1=perda entre 5 e 10%

do peso inicial; 3=perda entre 10% e 20% do peso inicial; 4=perda superior a 20% do peso inicial; Sinais de morbidade; 0=sem sinais de morbidade; 1= pelos arrepiados; 2=pelos arrepiados e postura arqueada; 3=pelos arrepiados, postura arqueada e inatividade. O escore clínico compreende a soma da pontuação para cada um desses parâmetros (VIEIRA AT, *et al.* 2009).

AVALIAÇÃO DA DISBIOSE DA MICROBIOTA INTESTINAL

A avaliação da disbiose foi realizada pelo monitoramento da expansão do conteúdo de bactérias anaeróbicas facultativas nas fezes e no conteúdo luminal do cólon. Para isso, amostras de fezes e do conteúdo luminal foram diluídas em solução de NaCl 0,9% p/v estéril e cultivadas nos meios sólidos seletivos de MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas, para avaliação do número de unidades formadoras de colônias de enterobactérias.

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE BACTÉRIAS FECAIS

Cerca de 8-10 pellets fecais foram coletados dos animais de um determinado grupo experimental e armazenados em um microtubo estéril. As fezes foram incubadas à temperatura de 56°C por 10 minutos em banho seco e, em seguida, dissolvidas em 1ml de PBS com auxílio de uma ponteira estéril. Após centrifugação a 6000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado e a fase superior contendo células microbianas, formada acima do sedimento de material luminal, foi ressuspensa em PBS e transferida para outro microtubo. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes e o sedimento final de células microbianas foi ressuspensa em 200 µL de solução de lise bacteriana (Tris-HCl 50mM pH=8,0, EDTA 100nM, Glicerol 10%, Triton x100 0,5%, PMSF 1mM, DTT 1mM, NaCl 200mM, DNase I 100U/mL, MgCl₂ 10mM, RNase 25µg/mL e Lisozima 200µg/mL). Após isso, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de sonicação de 30 segundos com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo em sonicador MSE Soniprep. As amostras foram, então, incubadas no gelo por 30 minutos; em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e aliqotado e armazenado a -80°C para posterior utilização.

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE ISOLADOS BACTERIANOS DISBIÓTICOS

Bactérias isoladas dos meios sólidos utilizados para quantificação de UFCs foram crescidas em meio caldo BHI por 24 horas a 37°C em aerobiose. Após esse período, as células foram lavadas

em solução de NaCl 0,9% p/v e, após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, ressuspendidas em 1 mL de solução de lise bacteriana (Tris-HCl 50mM pH=8,0, EDTA 100nM, Glicerol 10%, Triton x100 0,5%, PMSF 1mM, DTT 1mM, NaCl 200mM, DNase I 100U/mL, MgCl₂ 10mM, RNase 25µg/mL e Lisozima 200µg/mL). Após isso, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de sonicação de 30 segundos com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo em sonicador MSE Soniprep. As amostras foram, então, incubadas no gelo por 30 minutos; em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e aliquoteado e armazenado a -80°C para posterior utilização.

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS BACTERIANOS

A quantificação de proteínas nos extratos bacterianos obtidos foi feita utilizando-se o reagente de Bradford, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante (BIORAD). Brevemente, alíquotas diluídas em água dos extratos proteicos foram diluídas no reagente de Bradford na proporção de 1:20, em duplicatas. A absorbância a 595 nm foi obtida em espectrofotômetro e a concentração de proteínas obtida comparando-se com uma curva padrão de Albumina sérica bovina submetidas ao mesmo procedimento.

ELISAs

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para dosagem de anticorpos no soro, o sangue foi coletado em tubos previamente heparinizados (heparina sódica a 500 U/mL) e após centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado para posterior análise. Para dosagem de anticorpos nas fezes, as amostras de fezes dissolvidas na proporção de 10% p/v em solução salina de NaCl 0,9% p/v foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado para análise. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgA, IgG E IgM TOTAIS

Para a quantificação de anticorpos totais (IgG, IgM e IgA) foi utilizado a técnica de ELISA. Para isso, placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram sensibilizadas com 100µL de anticorpo purificado anti-Imunoglobulinas (Southern Biotech) diluídos em PBS na proporção de 1:5000 e incubadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após esse tempo, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-Tween 20. Em seguida, foi realizado o bloqueio com

BSA (200µL de BSA 1% p/v em PBS) por uma hora a temperatura ambiente seguido de 2 lavagens. Em seguida, as amostras de soro foram diluídas nas proporções adequadas (IgG no soro: ~1:50.000; IgG nas fezes: ~1:1000; IgM no soro: ~1:2000; IgM nas fezes: ~1:100; IgA no soro: ~1:2000; IgA nas fezes: 1:100) em solução de BSA a 0,1% p/v em PBS e 50 µL foram incubadas 1 hora a 37°C. Após esse tempo e mais dois ciclos de lavagens, foi realizado a incubação com o anticorpo goat anti-mouse IgG biotilado, ou goat anti-mouse IgM, ou goat anti-mouse IgA biotilado (Southern biotech) na diluição de 1:5000 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS, sendo 100 µL por poço, por 1 hora a 37°C. Após mais uma lavagem, foi feita a incubação com Estreptavidina acoplada à enzima peroxidase (R&D Systems). Para isso, foi adicionado 100 µL de Estreptavidina na diluição 1:200 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem da placa e foi feito a revelação, pela adição de 100µL/poço do cromógeno L-o-fenilenodiamina (Sigma) na concentração de 400µg/mL, contendo o substrato H₂O₂ (6,6 mM) em tampão citrato (pH 5,0). Após a ocorrência da reação, a reação foi parada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ a 1M e a absorbância lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492nm (Status-labsystems, multiskan RC, niscience do Brasil).

QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-MICROBIOTA FECAL

Após a quantificação, 100 µL de uma solução a 10µg/mL dos extratos de bactérias fecais em PBS foram adicionadas aos poços de placa de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) e incubados por 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após esse tempo, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-Tween 20. Em seguida, foi realizado o bloqueio com BSA (200µL de BSA 1% p/v em PBS) por uma hora a temperatura ambiente seguido de 2 lavagens. Em seguida, as amostras de soro foram diluídas nas proporções adequadas (IgG no soro: ~1:100; IgM e IgA no soro: ~1:20; IgG nas fezes: ~1:2) em solução de BSA a 0,1% p/v em PBS e 50 µL foram incubadas 1 hora a 37°C. Após esse tempo e mais dois ciclos de lavagens, foi realizado a incubação com o anticorpo goat anti-mouse IgG biotilado, ou goat anti-mouse IgM, ou goat anti-mouse IgA biotilado (Southern biotech) na diluição de 1:5000 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS, sendo 100 µL por poço, por 1 hora a 37°C. Após mais uma lavagem, foi feita a incubação com Estreptoavidina acoplada à enzima peroxidase (R&D Systems). Para isso, foi adicionado 100 µL de Estreptavidina na diluição 1:200 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem da placa e foi feito a revelação, pela adição de 100µL/poço do cromógeno L-o-fenilenodiamina (Sigma) na

concentração de 400µg/mL, contendo o substrato H₂O₂ (6,6 mM) em tampão citrato (pH 5,0). Após a ocorrência da reação, a reação foi parada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ a 1M e a absorbância lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492nm (Status-labsystems, multiskan RC, niscience do Brasil).

QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-EXTRATOS BACTERIANOS DISBIÓTICOS

Após a quantificação, 100 µL de uma solução a 10µg/mL dos extratos de isolados bacterianos em PBS foram adicionadas aos poços de placa de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) e incubados por 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após esse tempo, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-Tween 20. Em seguida, foi realizado o bloqueio com BSA (200µL de BSA 1% p/v em PBS) por uma hora a temperatura ambiente seguido de 2 lavagens. Em seguida, as amostras de soro foram diluídas nas proporções adequadas (IgG no soro: ~1:100; IgM e IgA no soro: ~1:20; IgG nas fezes: ~1:2) em solução de BSA a 0,1% p/v em PBS e 50 µL foram incubadas 1 hora a 37°C. Após esse tempo e mais dois ciclos de lavagens, foi realizado a incubação com o anticorpo goat anti-mouse IgG biotilado, ou goat anti-mouse IgM, ou goat anti-mouse IgA biotilado (Southern biotech) na diluição de 1:5000 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS, sendo 100 µL por poço, por 1 hora a 37°C. Após mais uma lavagem, foi feita a incubação com Estreptoavidina acoplada à enzima peroxidase (R&D Systems). Para isso, foi adicionado 100 µL de Estreptoavidina na diluição 1:200 em solução de BSA 0,1% p/v em PBS, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem da placa e foi feito a revelação, pela adição de 100µL/poço do cromógeno L-o-fenilenodiamina (Sigma) na concentração de 400µg/mL, contendo o substrato H₂O₂ (6,6 mM) em tampão citrato (pH 5,0). Após a ocorrência da reação, a reação foi parada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ a 1M e a absorbância lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492nm (Status-labsystems, multiskan RC, niscience do Brasil).

PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgG DO SORO DE CAMUNDONGOS:

Após retirada de sangue de animais selvagens C57BL6 e centrifugação, o plasma foi utilizado para a purificação dos anticorpos IgG. Para isso, foi utilizado o kit *T-gelTM Purification kit* conforme as instruções do fabricante. Inicialmente, a coluna de afinidade a IgG foi equilibrada com o tampão de ligação (*binding buffer*), e então o plasma retirado dos animais selvagens foi passado na coluna, seguido de lavagem da coluna por três vezes com uma solução de *binding buffer*. Seguiu-se com a eluição usando o *elution buffer* e o eluído foi coletado e armazenado.

Após essa etapa de eluição, o material eluído foi concentrado usando-se uma coluna de concentração *Millipore* com *cut-off* de 100kDa e o concentrado foi utilizado para quantificação de proteínas.

AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO E FRACIONAMENTO DO CÓLON:

O cólon foi removido após eutanásia e o seu comprimento foi determinado com auxílio de uma régua. Foi medido o comprimento entre a válvula ileocecal e o reto do trato intestinal distal. Após a medida, o cólon foi dividido em partes iguais para as análises de quantificação das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG). Em outros experimentos, o cólon foi preparado para análise histológica.

ANÁLISE HISTOLÓGICA:

Amostras do cólon foram removidas e armazenadas em cassetes de histologia e então fixadas em solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato pH=7,4 durante 24h. Posteriormente, as amostras foram processadas segundo protocolo de desidratação com banhos em soluções de etanol de diferentes concentrações (70% p/v, 80% p/v, 85% p/v, 95% p/v e 100% p/v por três vezes), durante 40 minutos, cada. Posteriormente, as amostras foram embebidas em xilol, por dois ciclos de 20 min; posteriormente, em parafina líquida (3 banhos de 30 minutos) e então, incluídos em blocos de parafina (Paraplast, Sigma). Os tecidos incluídos em parafina foram cortados posteriormente em micrótomos, com espessuras de 5µm e distendidos sobre lâminas de microscopia previamente identificadas. Após desparafinação (imersão em xilol, álcool absoluto, álcool 90% p/v, 80% p/v, 70% p/v e água), as lâminas foram coradas em corante hematoxilina (90 segundos) e eosina (90 segundos), segundo protocolo de coloração H&E. Após serem novamente desidratadas, as lâminas foram diafanizadas e montadas com Entelan para análise em microscópio óptico.

A graduação histopatológica dos cortes histológicos do cólon corados com H&E foi determinada segundo quatro diferentes parâmetros: Inflamação (0 a 4: ausente, leve, moderada, intensa ou muito intensa, respectivamente); lesão tecidual (0 a 3: ausente, erosão ou ulceração, respectivamente); arquitetura da cripta (0 a 2: normal, perda parcial da arquitetura ou perda total da arquitetura, respectivamente); presença de células caliciformes nas criptas e no epitélio (0 a 1: normal, diminuição de células caliciformes, respectivamente); edema (0 e 1: ausente e

presente, respectivamente); hemorragia (0 a 2: ausente a intensa, respectivamente) e hiperemia (0 e 1: ausente e presente, respectivamente). O escore máximo é 14.

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA ENZIMA NOS2

A preparação inicial das secções foi realizada de acordo com o previamente descrito no item anterior. 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. Após o bloqueio, realizou-se a marcação da enzima NOS2 depositada com o anticorpo Anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology). 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 estreptovidina-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 (3 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 36 lâminas com Entellan. A determinação de células iNOS+ 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 iNOS+ por campo.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no tecido foi obtida pelos ensaios da atividade da mieloperoxidase (MPO) como descrito em (SOUZA et al, 2003). Os fragmentos teciduais foram removidos e congelados a -20°C . Após descongelamento, o tecido (100mg de tecido em 2mL de solução tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M de Na_3PO_4 , 0,015 M de Na_2EDTA), utilizando homogeneizador elétrico (Power Gen 125- Fischer Scientific, Pennsylvania, USA) e, após centrifugação por 10 min a 10000 rpm a 4°C , o precipitado foi submetido à lise hipotônica de hemácias (1 mL de solução de NaCl 0,2% p/v seguido da adição, 30 segundos após, de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% p/v e glicose 5% p/v). Após nova centrifugação sob as mesmas condições anteriores, o precipitado foi ressuspensionado em tampão Na_3PO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexa-decil-trimetil-amônio (HTAB) 0,5% p/v e re-homogeneizado. Aliquotas de 1mL de suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 10000 rpm a 4°C e recolhidos os sobrenadantes.

A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspensionado foi calculada pela medida das alterações em densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando-se de TMB (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). A reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados foram expressos como OD a 450nm.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE N-ACETILGLICOSAMINIDASE (NAG)

A quantificação do número de macrófagos foi realizada pelo ensaio de NAG. Os fragmentos teciduais foram removidos e congelados a -20°C . Após descongelamento, o tecido (100mg de tecido em 2mL de solução tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M de Na_3PO_4 , 0,015 M de Na_2EDTA), utilizando homogeneizador elétrico (Power Gen 125- Fischer Scientific, Pennsylvania, USA) e, após centrifugação por 10 min a 10000 rpm a 4°C , o precipitado foi submetido à lise hipotônica de hemácias (1 mL de solução de NaCl 0,2% p/v seguido da adição, 30 segundos após, de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% p/v e glicose 5% p/v). Após nova centrifugação sob as mesmas condições anteriores, o precipitado foi ressuspensionado em solução de NaCl 0,9% p/v / Triton x 100 0,1% v/v e centrifugado novamente. Posteriormente foram adicionados 100 μL das amostras diluídas em tampão citrato/fosfato (composição) a uma placa de 96 poços, em duplicata. Posteriormente foram

adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida) e a placa incubada a 37°C por 10 min. Após esse período adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M e realizada a leitura em espectrofotometro 405 nm.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO)

O ensaio do EPO foi realizado conforme descrito por STRATH, 1985 (VIEIRA et al, 2009). Resumidamente, para cada 100 mg de cólon foi utilizado 1,9 ml de PBS para homogeneizar o tecido. Em seguida, foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as hemácias lisadas conforme descrito anteriormente. As amostras foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições anteriores, o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 1,9 ml de 0,5% de brometo de hexa-decil-trimetil-amônio em PBS. Posteriormente, o homogenato final foi congelado três vezes em nitrogênio líquido, e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático com a adição de um montante de cromógeno (1,5 mmol de L-o-fenilenodiamina) e do substrato (6,6 mM de H₂O₂) em tampão Tris-HCl 0.075 mM, pH=8. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M e lida na absorbância de 492 nm em espectrofotometro.

MARCAÇÃO DE BACTÉRIAS FECAIS E LUMINAIS E CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAR DEPOSIÇÃO DE IgG:

A marcação de bactérias fecais foi realizada com DAPI e avaliada através de citometria de fluxo. Para isso, fezes ou conteúdo luminal dos animais submetidos ao protocolo experimental nos dias 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 60 foram coletadas e distribuídas em microtubos. As amostras foram pesadas, dissolvidas em solução salina de NaCl a 0,9% p/v e filtradas em filtro *Cell Strainer*® de 70µm, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e, após desprezar o sobrenadante, ressuspendidas na proporção de 100 mg de fezes por 1 mL de PBS contendo BSA 0,5% p/v. 10 µL dessa suspensão foram marcadas com um mix de anticorpos contendo anti-mouse IgA biotinizado (Southern Biotech), anti-mouse IgG conjugado a Alexa 647 (Cell Signalling) e anti-mouse IgM conjugado a Ficoeritrina (BioLegend) diluídos em PBS contendo BSA 0,5% p/v, num volume final de 50 µL em placa de 96 poços com fundo em U e incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos. Após a incubação as amostras foram lavadas com 150µl de PBS contendo BSA 0,5% p/v e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram novamente incubadas com 25 µL de

Estreptoavidina acoplada a PE/Cy5 (BioLegend) por 20 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Após incubação, as amostras foram novamente lavadas e centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 200 µL de solução de fixação (formaldeído a 2% p/v em PBS) por 20 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Após essa etapa as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 200µL da solução de permeabilização (110 mM de ácido cítrico; 4.1 mM Tween 20) e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de solução de DAPI a 10 µM em PBS e incubadas por mais 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. 50 mil eventos positivos para DAPI foram adquiridos no citômetro FACSCanto II, após configuração para aquisição de eventos de tamanho semelhantes a *beads* fluorescentes de 1 µm de tamanho, e analisadas no programa Flow Jo (Tree Star Inc) conforme estratégia exemplificada na figura abaixo. Em experimentos envolvendo grupos de animais que receberam um coquetel de antimicrobianos, 10 mil *beads* fluorescentes de 1 µm de tamanho foram adquiridas.

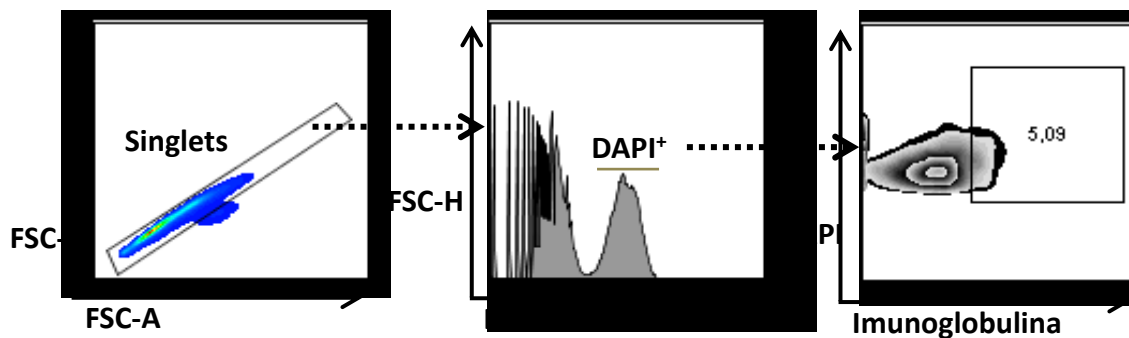


Figura 4– Estratégia para análise da deposição de imunoglobulinas em bactérias fecais e luminais. Amostras de fezes e conteúdo luminal, preparadas conforme a descrição acima, foram adquiridas em citômetro FACSCanto II e analisadas no programa Flow Jo. Para isso, eventos únicos (*Singlets*) foram estratificados em células, pela marcação com DAPI, e então avaliados quanto à deposição de Imunoglobulinas de acordo com a fluorescência relevante.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações realizadas entre o grupo tratado com água e o grupo tratado com DSS ao longo do tempo foram feitas pela ANOVA “two way”, com pós teste de Bonferroni. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls para grandezas paramétricas e pós-teste de Kruskal-Wallis para grandezas não paramétricas. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi

utilizado o teste “t de student”. Os resultados foram apresentados como média \pm 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 5.0, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS:

IgG induzida pela microbiota parece ter um papel no controle da microbiota disbiótica após a colite ulcerativa:

Trabalhos anteriores demonstraram que IgGs induzidas pela microbiota são importantes para conter a translocação bacteriana e a bacteremia induzida por colite ulcerativa (Kamada N, et al. 2015). Nossa hipótese é que essas IgGs induzidas pela microbiota são importantes também para o controle da composição da microbiota após uma perturbação, auxiliando no controle da disbiose intestinal característica da colite ulcerativa. Tendo essa hipótese em mente, nosso primeiro objetivo foi avaliar se anticorpos induzidos pela microbiota seriam mais ávidos por antígenos provenientes de uma microbiota disbiótica. Assim, buscamos determinar quando havia disbiose da microbiota intestinal após a indução da colite ulcerativa. Para isso, foram realizados alguns experimentos onde um grupo de animais foi exposto ao DSS e um outro grupo recebeu somente água (Controle) e esses animais foram acompanhados por 30 dias quanto ao peso corporal, à graduação clínica da doença e ao conteúdo de enterobactérias nas fezes, sendo os dois primeiros parâmetros usados como índices de doença e o último, como índice de disbiose. Como demonstrado na (figura 5-A), animais submetidos ao modelo de colite (DSS 2% por 9 dias) apresentaram uma perda de peso superior a 10% do peso inicial nos dias 10 e 15 após o início do tratamento com DSS. Além disso, os animais desse grupo apresentaram um aumento da graduação clínica a partir do dia 5 após o início do tratamento, que durou até o dia 15 após início do tratamento com DSS e que teve seu pico no dia 10 após o início da indução da colite (Figura 5-B). Por fim, o conteúdo de enterobactérias nas fezes (Figura 5-C) dos animais que receberam DSS foi maior que o daqueles animais que receberam água nos dias 5, 10 e 15 após o início do experimento. Esses resultados sugerem que no pico da colite ulcerativa induzida por DSS há uma expansão de enterobactérias na microbiota fecal, indicativo de disbiose na microbiota.

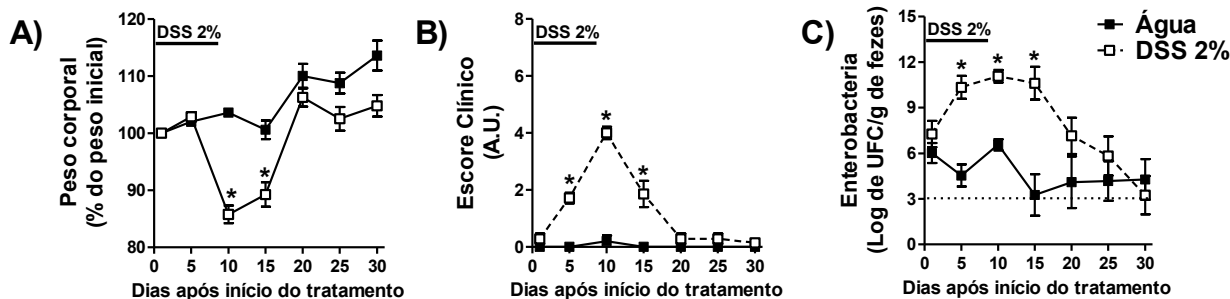


Figura 5: A indução da colite ulcerativa com DSS leva à expansão do número de Enterobactérias nas fezes dos camundongos. A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 2% em água de beber por 9 dias em camundongos C57/BL6. Animais controle receberam apenas água. Os animais foram avaliados em tempos específicos conforme o gráfico para avaliação do peso corporal (A), escore clínico da doença (B) e conteúdo de enterobactérias nas fezes (C). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. $n=5-7$. $*P<0,05$ Vs Água.

Nosso próximo passo foi avaliar se animais colonizados apresentam anticorpos circulantes que são mais ávidos por antígenos obtidos da microbiota fecal de animais em disbiose do que por antígenos obtidos da microbiota de animais em eubiose. Assim, antígenos foram obtidos de bactérias fecais de animais controle ou de animais submetidos ao protocolo de indução da colite por 9 dias e submetidos a um ensaio de ELISA para IgG circulante presente no soro de animais colonizados eubióticos. Como demonstrado na (figura 6-A), houve maior concentração de IgG circulante reativa a antígenos de microbiota disbiótica (D10) do que a antígenos de microbiota eubiótica (D1). Tais anticorpos reativos à microbiota disbiótica parecem ser induzidos pela colonização com a microbiota normal, pois animais GF apresentam concentrações reduzidas de IgG anti-microbiota disbiótica e animais convencionizados por 14 dias passam a ter IgG circulante reativa à microbiota disbiótica (Figura 6-B). Esses dados sugerem que há IgG circulante em animais colonizados que são mais ávidos à microbiota disbiótica.

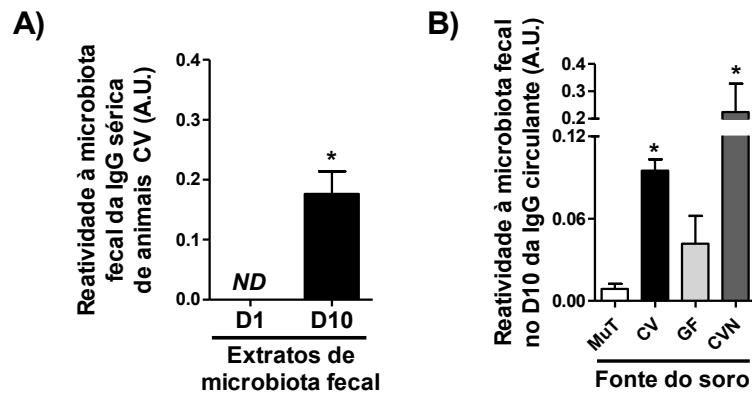


Figura 6: Anticorpos induzidos pela microbiota são mais reativos à microbiota disbiótica. Foi realizado ELISA com soro de animais CV eubióticos (A) para testar a reatividade de IgG contra antígenos extraídos de bactérias das fezes de camundongos em eubiose (D1) e em disbiose, induzida por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias (D10). No gráfico B foi testado a reatividade do soro de animais MuT, animais convencionais (CV), animais Germ-Free (GF) e animais convencionalizados (CVN) a antígenos extraídos da microbiota fecal de animais em disbiose, induzida por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias (D10). As barras representam a média \pm erro padrão. Em A, * $P < 0,05$ vs D1, e em B * $P < 0,05$ vs MuT. N=3 a 6. A.U.: unidades arbitrárias.

Para avaliar se esses anticorpos circulantes poderiam desempenhar algum papel no controle da disbiose induzida pela colite ulcerativa, dosamos a concentração de IgG no conteúdo fecal dos animais submetidos à colite ulcerativa induzida por DSS. Nossos resultados demonstraram que há aumento da concentração fecal de IgG a partir do dia 5 após o início do tratamento com DSS e esse aumento se mantém até o dia 30 após o início da indução da colite (Figura 7-A). De forma interessante, ao comparar-se as alterações nas concentrações fecais de IgG com as de UFCs de Enterobactérias nas fezes, observamos que a quantidade de enterobactérias passava a diminuir nas fezes ao mesmo tempo que a quantidade de IgG atingia seu pico (Figura 7-B). Em conjunto, esses dados suportam a ideia que o aumento da concentração de IgG fecal pode desempenhar algum papel no controle da disbiose da microbiota após colite ulcerativa.

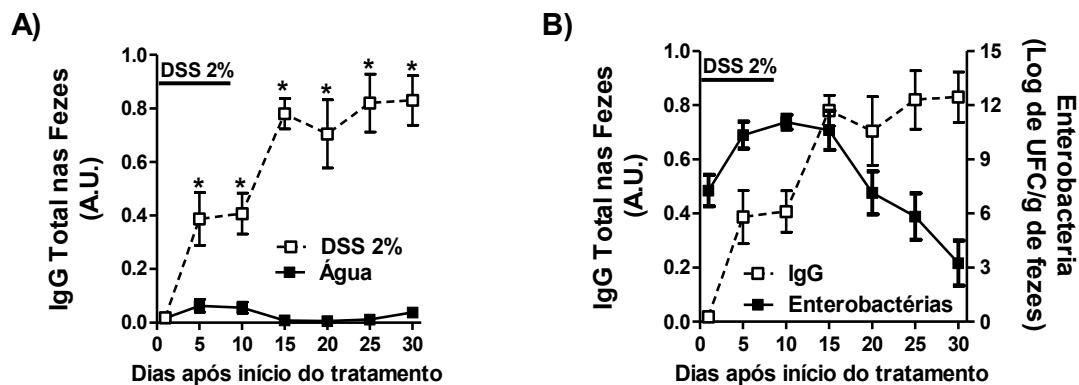


Figura 7: Concentração fecal de IgG aumenta após a indução da colite concomitantemente à redução do conteúdo de Enterobactérias nas fezes. Foi avaliado por ELISA a concentração de IgG total nas fezes (A) de animais submetidos a colite induzida por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias e de animais controle, que receberam apenas água. No gráfico B estão apresentados os resultados da quantificação de IgG, dosado por ELISA, e de enterobactérias, avaliado pela quantificação de UFCs em ágar MacConkey. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. $n=5-7$. * $P<0,05$ Vs Água. A.U.: unidades arbitrárias.

A disbiose da microbiota intestinal é mais duradoura que a doença induzida pela colite ulcerativa:

Nosso próximo passo foi caracterizar temporalmente as alterações clínicas, histopatológicas, inflamatórias e microbiológicas do modelo de colite ulcerativa utilizado no trabalho. Assim, procedemos ao modelo de colite induzida por DSS e em momentos específicos, eutanasiámos os animais e coletamos amostras de cólon, sangue, fezes e conteúdo luminal do cólon para as diversas análises. Observamos que, após a indução da colite com DSS na concentração 2% p/v, os animais apresentaram uma discreta redução do peso corporal no dia 10 (Figura 8-A), que não foi estatisticamente significativa em relação aos animais do dia 1. Embora não tenham perdido peso, os animais passaram a apresentar um aumento significativo no escore clínico (Figura 8-B) 5 dias após a indução da colite, apresentando a maior pontuação no dia 10, quando as fezes dos animais apresentavam alterações na sua consistência e sangue oculto. No dia 15, a graduação clínica foi menor que no dia 10, embora ainda maior que no dia 1, sendo que no dia 20 os animais apresentaram um escore clínico semelhante aos animais do dia 1. A indução da colite também causa um encurtamento do tamanho do cólon (Figura 8-C) dos animais submetidos a doença. Esse encurtamento passa a ser significativo 5 dias após a indução da doença, e dura até o dia 20 do protocolo experimental. Após o dia 30, esses animais já deixam de expressar esse fenótipo de encurtamento do cólon, passando a apresentar o comprimento de

cólon semelhante aos animais do dia 1. Assim, a administração de DSS leva a uma doença que tem seu pico no dia 10 após o início do tratamento e que se resolve entre o dia 15 e 20 do protocolo experimental.

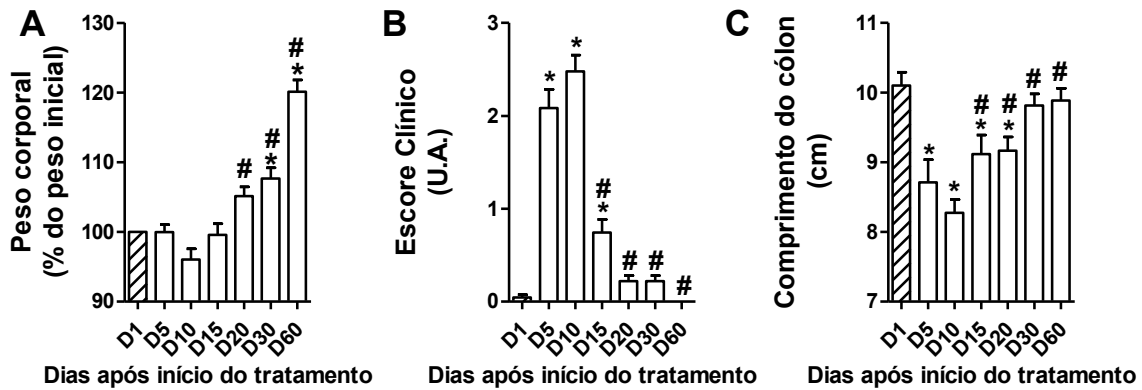
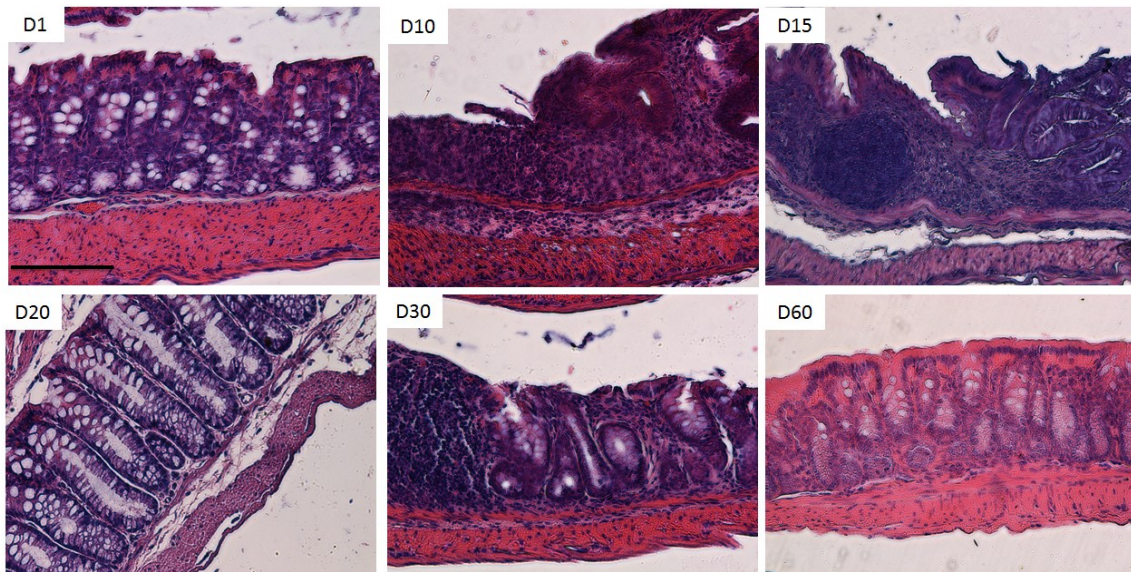


Figura 8: Curso temporal das alterações clínicas induzidas pela administração de DSS a camundongos. Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram acompanhados ao longo dos experimentos para avaliação do peso corporal (A), escore clínico da doença (B) e comprimento do cólon (C). As barras representam a média \pm erro padrão. Cinética observada em 6 experimentos. N=30 *P<0,05 vs D1 ou #P<0,05 vs D10.

Após definirmos acima os dias em que houve maiores alterações em relação aos parâmetros clínicos, avaliamos as alterações histopatológicas que ocorriam ao longo da colite induzida pelo DSS. Para a graduação histopatológica (figura 9) foram considerados as seguintes variáveis: infiltrado inflamatório; presença de células caliciformes; estrutura das criptas; presença de edema; presença de erosão e/ou ulceração do epitélio; presença de hemorragia; e presença de hiperemia. O que observamos ao longo do tempo foi que houve um intenso infiltrado inflamatório nos dias 10, 15 e 20 após a indução da colite. Foi observado também perda da arquitetura das criptas 15 dias após a indução da colite. Ainda, houve erosão e ulceração do cólon, observadas a partir da indução da colite, porém foi observado um aumento estatisticamente significativo apenas após 15 dias após o início da indução da colite. Ao analisarmos o escore histopatológico total, o que observamos foi que a maior pontuação histopatológica foi observada 15 dias após o início da indução da doença, sendo que apenas 60 dias após o início do protocolo pudemos observar o restabelecimento da arquitetura normal do cólon.

A)



B)

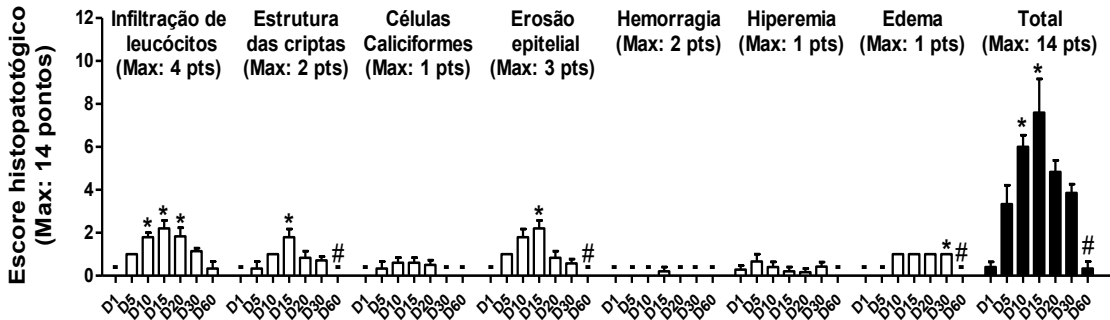


Figura 9: Curso temporal das alterações histopatológicas do cólon de animais submetidos a indução da colite ulcerativa. Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram eutanasiados e o cólon foi retirado para análise histopatológica por coloração por H&E. As imagens da prancha histológica (A) demonstram as alterações histopatológicas observadas ao longo da doença nos dias 1, 10, 15, 20, 30 e 60 após o início do protocolo experimental. A barra, na prancha histológica, representa 100µm. Em B, a descrição detalhada de cada parâmetro analisado para a definição do escore histopatológico. As imagens e o escore histopatológicos são representativos de um experimento contendo 4 a 7 camundongos em cada grupo. Em B, as barras representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs D1 ou #P<0,05 vs D15.

Além das análises histopatológicas, avaliamos o influxo de leucócitos para o tecido do cólon após a indução da colite, através da análise da atividade de enzimas específicas de diferentes

populações leucocitárias. Ao fazer análise do influxo de neutrófilo (MPO) no cólon (Figura 10-A), observamos que apenas no dia 10 após a indução da doença observa-se um maior infiltrado neutrofílico no cólon dos animais. Após o dia 15, a atividade de MPO no cólon foi semelhante à daquela de animais no dia 1 do protocolo experimental. Na análise da atividade de EPO (Figura 10-B), para quantificação de eosinófilos, houve um pequeno aumento apenas no dia 5 quando comparado ao grupo controle. Já a análise da atividade de NAG (Figura 10-C), que quantifica a enzima presente em macrófagos, demonstrou aumento apenas 20 dias após a indução da doença.

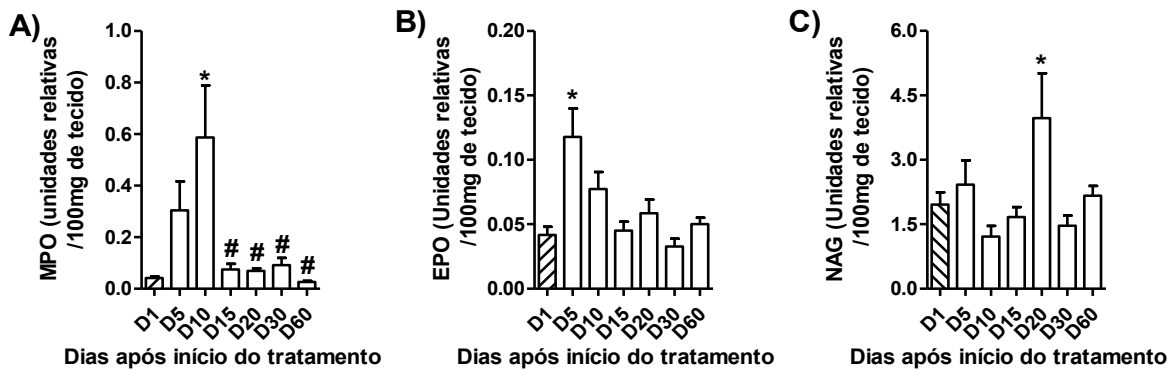


Figura 10: Avaliação temporal do influxo de leucócitos para o cólon de animais submetidos a colite ulcerativa. Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram eutanasiados nos momentos destacados e o cólon foi removido para a quantificação das atividades de MPO (A), EPO (B) e NAG (C). As barras representam a média \pm erro padrão. N= 4 a 12 animais. *P<0,05 vs D1 ou #P<0,05 vs D10.

Após a caracterização do perfil de infiltrado celular no modelo, buscamos avaliar o curso das alterações microbiológicas. Para isso, inicialmente, buscamos avaliar se havia expansão de bactérias anaeróbias facultativas após a indução da colite. Assim, animais foram acompanhados por 60 dias quanto ao conteúdo de enterobactérias nas fezes e no conteúdo luminal do cólon, pelo cultivo desse material em meios seletivos, em aerobiose. Como demonstrado na (figura 11-A), houve marcante expansão do conteúdo de enterobactérias nas fezes a partir do dia 5 do protocolo experimental. Tal aumento se manteve até o dia 20, retornando aos níveis basais no dia 30. Os resultados obtidos no conteúdo luminal foram semelhantes, com uma expansão do conteúdo de enterobactérias (Figura 11-B) no dia 10 após o início do tratamento com DSS, com retorno aos níveis basais 30 dias após o início do protocolo experimental. Em conjunto,

os dados sugerem que as alterações da microbiota intestinal induzidas por colite ulcerativa são mais duradouras que as alterações clínicas associadas ao modelo.

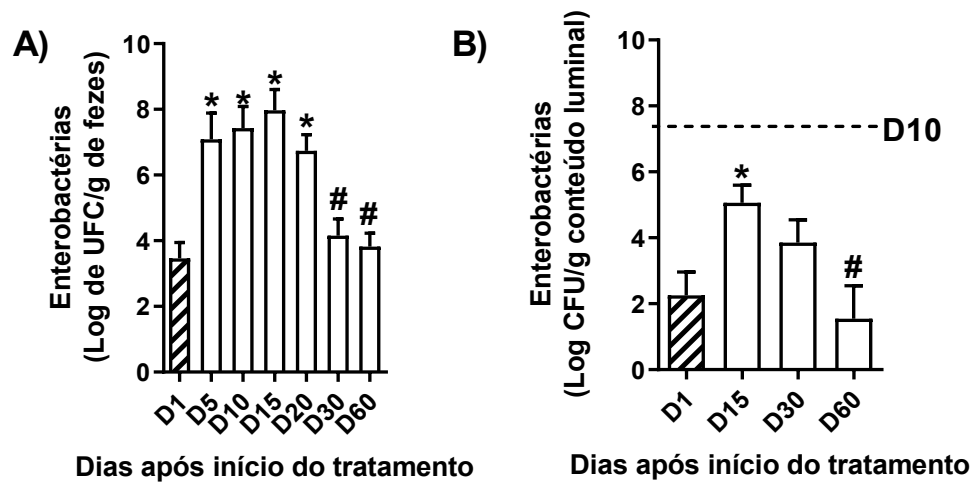


Figura 11: Avaliação temporal do conteúdo de bactérias anaeróbias facultativas na microbiota de animais com colite ulcerativa. Após a indução da colite induzida por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, as fezes desses animais foram coletadas para avaliação do conteúdo de Enterobactérias (A), avaliado pela quantificação de UFCs em ágar MacConkey. Para a coleta do conteúdo luminal os animais foram eutanasiados nos dias determinados e o conteúdo luminal foi removido para avaliação do conteúdo de Enterobactérias (B), avaliado pela quantificação de UFCs em ágar MacConkey. As barras representam a média \pm erro padrão. Em (B) a linha tracejada representa o valor da média do grupo do dia 10 do protocolo experimental. Cinética observada em 4 experimentos N= 13 *P<0,05 vs D1 ou #P<0,05 vs D10.

A microbiota disbiótica promove a lesão tecidual e leva a translocação microbiana para a circulação sanguínea:

Após realizarmos as padronizações e observarmos que a indução da colite com DSS levava a disbiose, buscamos avaliar como seria o fenótipo da doença eliminando a microbiota disbiótica desses animais pela administração de antibacterianos. Para isso, os animais foram submetidos ao protocolo de colite e após o quinto dia de indução da doença alguns grupos de animais passaram a receber os antimicrobianos em água de beber. Assim, os animais C57/BL6 foram divididos em grupo controle (que não receberam DSS ou antimicrobianos), grupos tratados com água e antimicrobianos a partir do dia 5 do experimento, grupo DSS + veículo, DSS + coquetel de antimicrobianos (contendo Vancomicina, ciprofloxacino e metronidazol) ou DSS + ciprofloxacino. No décimo dia do protocolo experimental, todos os animais foram sacrificados.

Os animais que receberam o DSS em água de beber e que não foram tratados com nenhum antimicrobiano apresentaram expansão da população de enterobactérias nas fezes quando comparado com animais tratados apenas com água filtrada. Os grupos DSS que foram tratados com mix de antibióticos ou ciprofloxacino, como esperado, não apresentaram expansão de enterobactérias nas fezes (Figura 12-A). Os grupos de animais submetidos a colite apresentaram pior escore clínico quando comparado aos seus respectivos grupos controle, independentemente de ser ou não tratados com os antimicrobianos (Figura 12-B). Porém, diferentemente dos outros grupos que receberam DSS, os animais do grupo DSS que receberam coquetel de antimicrobianos não apresentaram encurtamento do cólon quando comparado ao respectivo grupo controle (Figura 12-C). De forma interessante os animais do grupo DSS que não receberam nenhum antimicrobiano apresentaram maior translocação bacteriana para o fígado, efeito abolido nos animais que receberam DSS associado ao coquetel de antimicrobianos ou ao ciprofloxacino (Figura 12-D). Em conjunto esses dados demonstram que a presença da microbiota disbiótica promove a lesão tecidual e conseqüentemente a translocação de bactérias para a circulação sanguínea e que o tratamento com o coquetel de antimicrobianos impede esses dois eventos citados. Já o tratamento dos animais com colite com ciprofloxacino impediu apenas a translocação de bactérias para o fígado.

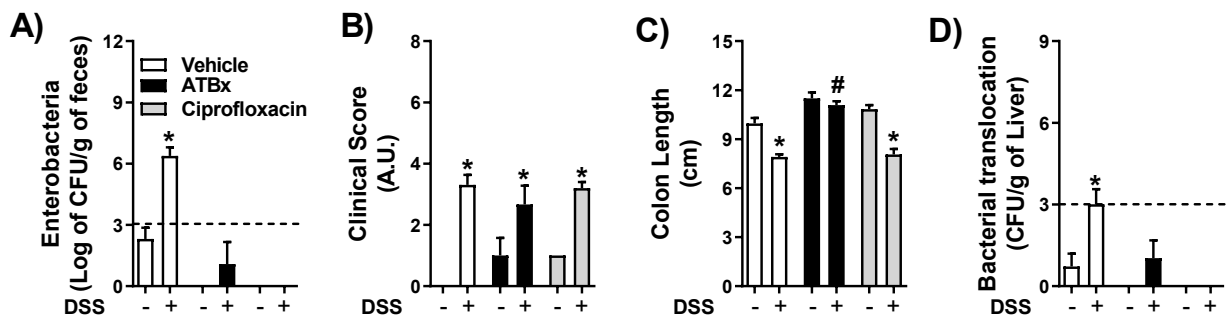


Figura 12: Microbiota disbiótica promove lesão tecidual e pode levar a translocação de bactérias para a circulação dos animais doentes. Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados no 10º dia do protocolo experimental para coleta de amostras para avaliação do conteúdo de enterobactérias nas fezes (A), escore clínico da doença (B) e comprimento do cólon (C) e translocação de bactérias para a circulação (D). A linha tracejada em A e D significa limite de detecção. As barras representam a média \pm erro padrão. N=4-7 animais por grupo *P<0,05 DSS vs Water ou #P<0,05 DSS ATBx vs DSS Vehicle.

Há translocação de IgG para o lúmen, que é reativa a bactérias da microbiota disbiótica e se liga à microbiota disbiótica em uma cinética compatível com um papel no controle da disbiose:

Após observarmos em experimentos anteriores que havia aumento da concentração fecal de IgG conforme as Enterobactérias expandiam nas fezes após a indução da disbiose pela colite ulcerativa buscamos analisar como seria o perfil de alteração das concentrações dos outros isotipos de anticorpos além de IgG, como por exemplo IgA e IgM. Para realizar esse ELISA foi utilizado o sobrenadante retirado após centrifugação da primeira diluição (10^{-1}) das fezes utilizada para fazer o cultivo em ágar MacConkey. De forma interessante não houve diferença estatística ao quantificarmos a imunoglobulina IgA total nas fezes (Figura 13-A) desses animais submetidos a colite nos dias analisados. Porém, houve aumento significativo da concentração de IgG (Figura 13-B) e IgM (Figura 13-C) nas fezes 15 dias após a indução da colite pelo DSS. As concentrações de ambas as imunoglobulinas retornaram aos níveis basais 60 dias após o início do protocolo experimental.

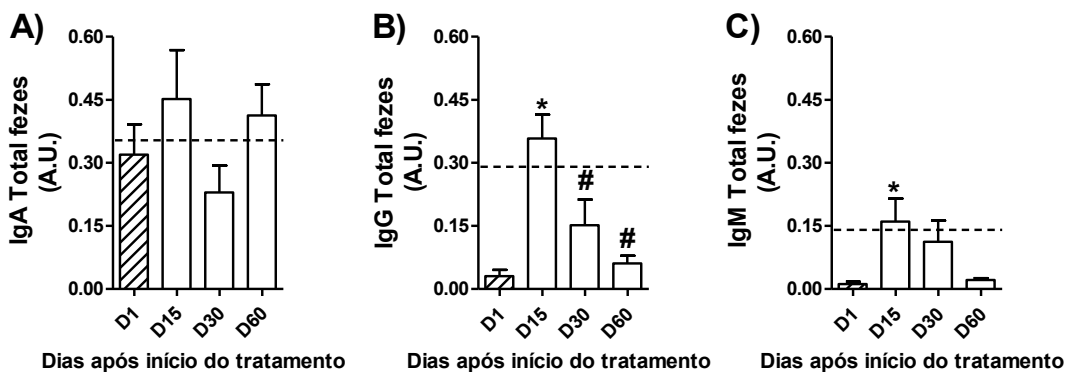


Figura 13: Avaliação temporal da concentração de imunoglobulinas nas fezes de animais submetidos ao modelo de colite ulcerativa: Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram acompanhados ao longo do tempo, as fezes desses animais foram coletadas e o sobrenadante da primeira diluição utilizado para fazer o plaqueamento em meios sólidos foi devidamente armazenado para quantificação total de IgA (A), IgG (B) e IgM (C) nas fezes. As barras representam a média \pm erro padrão. A linha tracejada representa o valor da média do grupo do dia 10 do protocolo experimental. N= 8-12 animais *P<0,05 vs D1 ou #P<0,05 vs D15. A.U.: unidades arbitrárias.

Ao percebermos que entre os isotipos de anticorpos, IgG era a que apresentava maior incremento de concentração nas fezes após a indução da colite com DSS 2% por 9 dias, buscamos entender se haveria, após a indução da disbiose, IgG reativo a microbiota disbiótica. Para isso, dosamos a concentração de IgG reativa a antígenos extraídos de bactérias das fezes

de animais com disbiose induzida pela colite nos dias 1, 15, 30 e 60 após a indução da doença. Além disso, avaliamos se parte dessa IgG seria reativa para antígenos extraídos de bactérias que foram previamente isoladas dos meios sólidos durante a disbiose nos animais. Como demonstrado na Figura 14, houve uma maior concentração de IgG reativo a antígenos da microbiota disbiótica (Figura 14-A), principalmente 15 dias após a indução da doença. Ainda, pudemos observar que também houve uma maior concentração de IgG que era específico para os antígenos de bactérias isoladas do Ágar MacConkey (Figura 14-B e 14-C), sugerindo assim que pudesse estar havendo uma resposta imune humoral contra essas bactérias que expandiram durante a disbiose induzida pela colite.

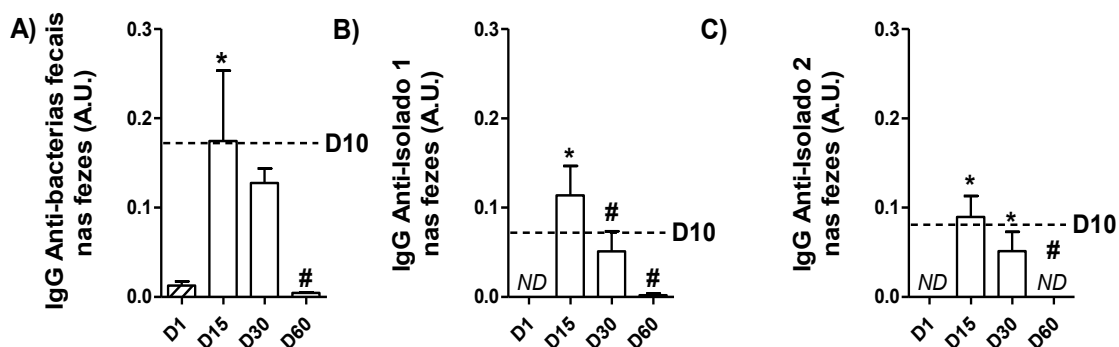


Figura 14: Há aumento da concentração de IgG reativo a microbiota disbiótica nas fezes de animais submetidos a colite ulcerativa. Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, as fezes desses animais foram coletadas e o sobrenadante da primeira diluição utilizado para fazer o plaqueamento em ágar MacConkey foi devidamente armazenado para quantificação total pelo método de ELISA para IgG reativo a antígenos extraídos de bactérias fecais (A) ou de isolados de Enterobactérias obtidos de animais que passaram por indução da colite ulcerativa (B e C). As barras representam a média \pm erro padrão. A linha tracejada representa o valor da média do grupo do dia 10 do protocolo experimental. N= 8-12 animais *P<0,05 vs D1 ou #P<0,05 vs D15. A.U.: unidades arbitrárias.

Como foi observado em experimentos anteriores que havia aumento da concentração de anticorpos reativos a microbiota disbiótica e que havia IgG específico para antígenos de bactérias que foram isoladas das fezes de animais com disbiose, buscamos avaliar se anticorpos estariam ligados às bactérias da microbiota desses animais durante a colite. Para isso, realizamos um outro experimento utilizando análise de citometria de fluxo em que avaliamos se bactérias do lúmen do cólon ou das fezes estavam ligadas a anticorpos dos isotipos IgA, IgG ou IgM. O que observamos com os resultados é que após 15 dias da indução da doença não foi observado aumento da proporção de bactérias ligadas a IgA (Figura 15-A e Figura 16) e a IgM

(Figura 15-C e Figura 16) no conteúdo luminal, porém havia uma quantidade significativa de células IgG⁺ nesse dia experimental (Figura 15-B e Figura 16). Além do conteúdo luminal nós avaliamos como seria a marcação nas fezes desses animais. E, de forma interessante, não houve um aumento significativo da marcação de células para nenhum dos isotipos 15 dias após a indução da disbiose pela colite (Figura 15-D a 15-F). Em contrapartida, houve aumento de ligação de IgM e IgA tanto em bactérias do lúmen quanto das fezes no dia 60 após o início do protocolo experimental.

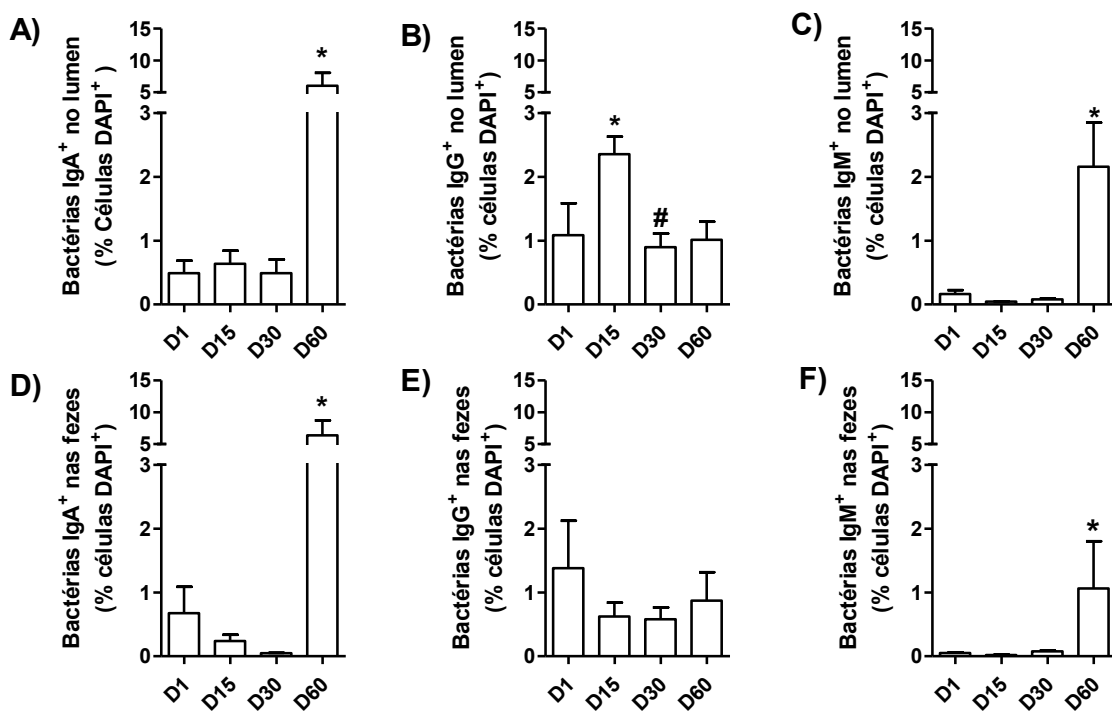


Figura 15: Há presença de IgG ligada a bactérias no lúmen mas não nas fezes dos animais submetidos a colite ulcerativa. Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram acompanhados ao longo do tempo. Para marcação de IgA (A), IgG (B) e IgM (C) no lúmen e nas fezes IgA (D), IgG (E) e IgM (F) os animais foram eutanasiados nos dias 1, 15, 30 e 60 após a indução da doença o conteúdo luminal cuidadosamente retirado e as amostras devidamente preparadas e marcadas com os anticorpos e DAPI. As barras representam a média ± erro padrão. N= 4-9 animais *P<0,05 vs D1 ou #P<0,05 vs D15.

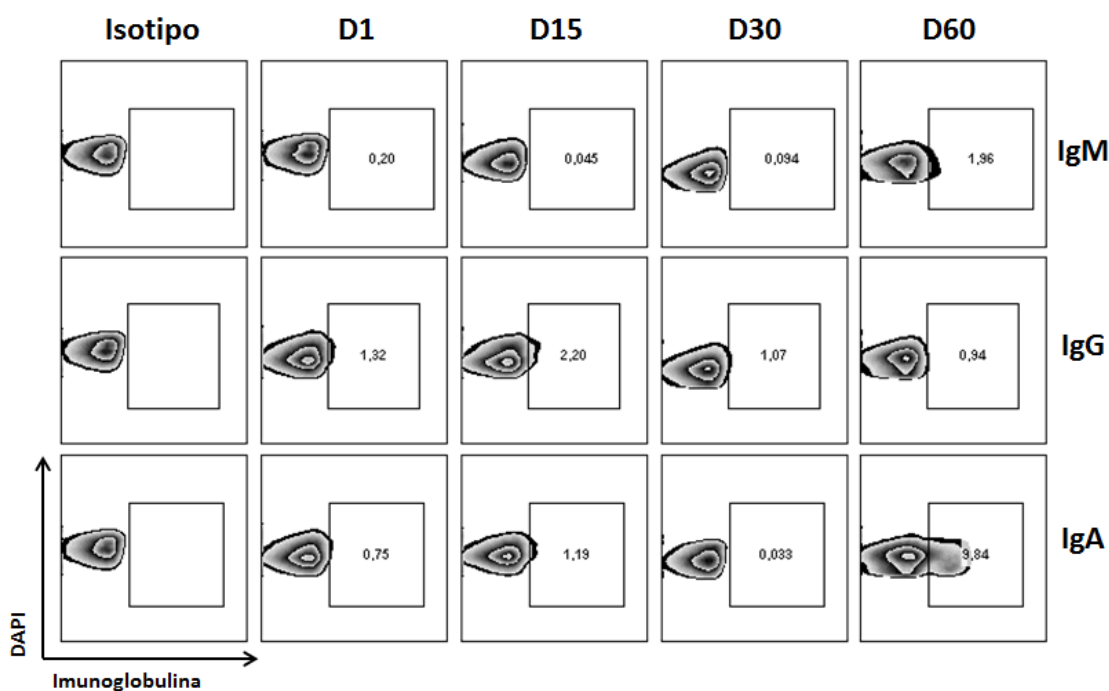


Figura 16: Há IgG ligada em bactérias do lúmen 15 dias após a indução da colite. Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram acompanhados ao longo do tempo. Os animais foram eutanasiados nos dias 1, 15, 30 e 60 após a indução da doença o conteúdo luminal cuidadosamente retirado e as amostras devidamente preparadas para marcação de IgA, IgG e IgM e de bactérias com DAPI. Zebra plots representativos de uma amostra de um N= 4-9.

Diante disso foram realizados alguns experimentos tratando esses animais com um coquetel de antimicrobianos contendo ciprofloxacino, metronidazol e vancomicina a partir do quinto dia do protocolo experimental e foi avaliado a quantidade de IgG reativa à microbiota fecal nas fezes ao longo do experimento. De forma interessante, o que pudemos observar foi que houve um aumento de IgG reativo a antígenos de bactérias fecais da microbiota disbiótica 15 dias após a indução da colite apenas no grupo que não recebeu o coquetel de antimicrobianos (Figura 17). Além disso, no dia 15 do protocolo experimental, houve uma menor quantidade de bactérias ligadas a IgG no conteúdo luminal de animais submetidos à colite ulcerativa tratados com o coquetel de antimicrobianos, como demonstrado na Figura 18.

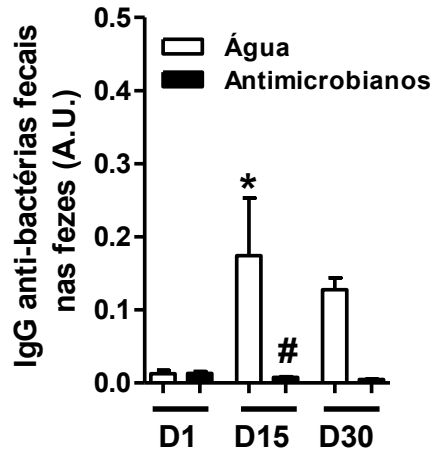


Figura 17: O tratamento com um coquetel de antimicrobianos impede o aumento da concentração de IgG anti-microbiota nas fezes de camundongos submetidos ao modelo de colite ulcerativa. Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram divididos em dois grupos tratados ou não com um coquetel de antimicrobianos a partir de cinco dias após o início do protocolo experimental. As fezes dos animais foram coletadas e foi realizado ELISA para quantificação de IgG reativo a antígenos de bactérias da microbiota fecal. As barras representam a média \pm erro padrão. N= 5 animais *P<0,05 vs D1 Controle ou #P<0,05 vs D15 Controle.

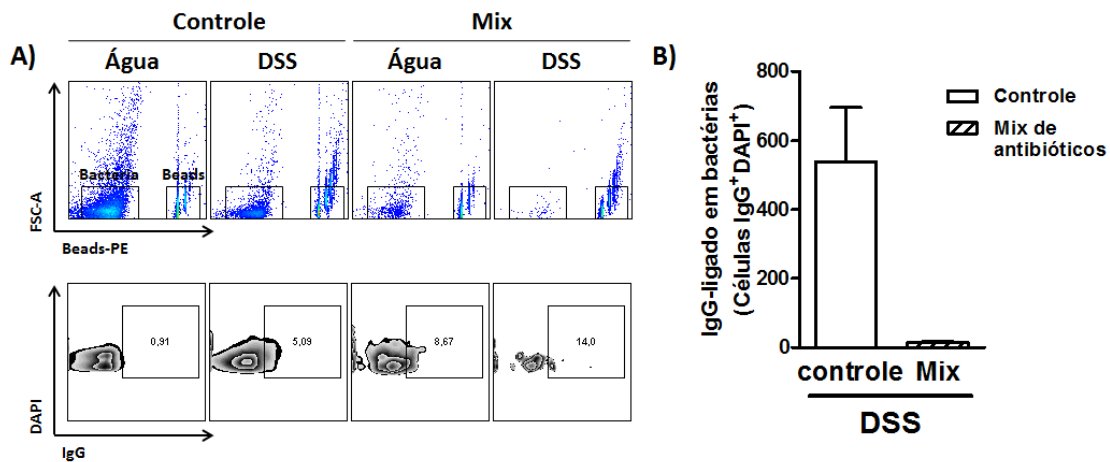


Figura 18: O tratamento com um coquetel de antimicrobianos impede o aumento da ligação de IgG a bactérias fecais durante a colite ulcerativa: Após a indução da colite por administração de DSS 2% p/v em água de beber por 9 dias, os animais foram divididos em dois grupos tratados ou não com um coquetel de antimicrobianos a partir de cinco dias após o início do protocolo experimental. 15 dias após o início do experimento, os animais foram eutanasiados e o conteúdo luminal foi coletado para análise da deposição de IgG a bactérias fecais. Em A, dot plots demonstrando o efeito do tratamento de antibióticos sobre a quantidade de bactérias no conteúdo luminal dos animais (plots superiores) e zebra plots demonstrando a percentagem de células IgG⁺ (plots inferiores). Plots

representativos de um N= 4-8 animais. Em B, as barras representam a média \pm erro padrão. N= 4-8 animais *P<0,05 vs controle ou #P<0,05 vs D15.

IgG controla a susceptibilidade à colite por impedir a translocação de táxons disbióticos mas não a lesão tecidual:

Todo o conjunto de dados demonstrados até aqui parece apontar para um papel importante envolvendo esses anticorpos IgG no controle da disbiose associada à colite. Para testar essa hipótese, experimentos utilizando animais deficientes de linfócitos B ($\text{MuT}^{-/-}$) submetidos a colite foram realizados. Além disso, para avaliar o papel da microbiota disbiótica na susceptibilidade dos animais $\text{MuT}^{-/-}$ à colite, foi realizado o tratamento com o coquetel de antimicrobianos descrito anteriormente a partir do dia 5 do protocolo experimental. Nossos resultados demonstraram que os animais $\text{MuT}^{-/-}$ se mostraram mais susceptíveis a colite quando comparados aos animais C57/Bl6 e grande parte dos animais $\text{MuT}^{-/-}$ não resistiram à indução da doença e acabavam sucumbindo antes do dia 10 após o início da exposição ao DSS (Figura 19-A). Os animais $\text{MuT}^{-/-}$, quando submetidos ao protocolo de colite com DSS 2.5%, apresentaram perda de peso bem acentuada quando comparado aos animais selvagens que receberam DSS (Figura 19-B). Porém, o tratamento com o mix de antibióticos melhorou consideravelmente esse fenótipo de perda de peso observado em ambos os grupos de animais ($\text{MuT}^{-/-}$ e selvagem). Em relação ao escore clínico (Figura 19-C), os animais $\text{MuT}^{-/-}$ DSS+veículo apresentam pior escore clínico no D8 quando comparado com os animais selvagens do mesmo grupo. Porém quando tratados coquetel de antimicrobianos os animais $\text{MuT}^{-/-}$ apresentaram redução do escore clínico.

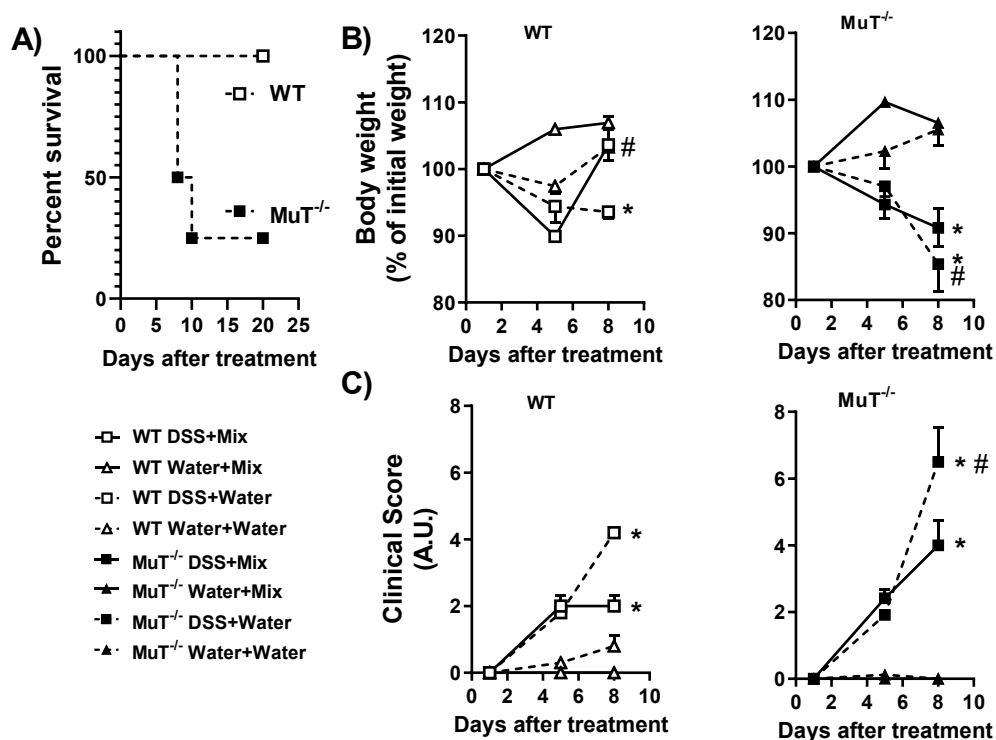


Figura 19: Animais MuT^{-/-} apresentam maior letalidade e susceptibilidade a doença quando comparado aos animais WT. A indução da colite foi feita por administração de DSS 2,5% p/v em água de beber por 8 dias em camundongos C57Bl6 e em animais MuT^{-/-}. Animais dos grupos que receberam mix de antimicrobianos foram tratados a partir do quinto dia do protocolo experimental com mix de antibióticos em água de beber até o momento da eutanásia. Os animais foram acompanhados ao longo dos experimentos para avaliação da letalidade (A) do peso corporal (B) e do escore clínico da doença (C). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. N=4-7 animais por grupo. *P<0,05 DSS+água Vs controle # P<0,05 DSS+água Vs DSS+água+Mix.

Diante desse fenótipo de susceptibilidade dos animais MuT^{-/-} à colite, as análises subsequentes foram realizadas no D8 após a indução da doença. Os animais também foram avaliados em relação ao comprimento do cólon (Figura 20-A) porém não houve encurtamento do tamanho do cólon seja nos animais MuT^{-/-} ou selvagens tratados com DSS quando comparados aos grupos controles.

Os animais WT e MuT^{-/-} submetidos a colite e que não foram tratados com mix de antimicrobianos apresentam escore histopatológico e infiltrado celular semelhantes (Figura 20-B e 20-C, respectivamente). A indução da colite leva a um aumento de infiltrado inflamatório quando comparado aos animais controles, porém não houve diferença estatística entre o grupo de animais MuT^{-/-} DSS+ água versus os animais WT DSS+ água (Figura 20-C). Esses dois parâmetros podem ser observados nas micrografias da Figura 21. Os níveis de IgG também

foram avaliados no D8 após a indução da doença (Figura 20-D), sendo que nos animais WT foi possível observar uma tendência de aumento nas concentrações de IgG nas fezes, porém ainda não significativo conforme o aumento observado no D10. Nos animais $MuT^{-/-}$, devido a ausência de linfócitos B, e conforme esperado não houve aumento nas concentrações de IgG. Ao analisarmos o conteúdo de enterobactérias nas fezes dos animais, é possível notar um aumento na quantidade de CFUs de enterobactérias nas fezes nos animais WT quando comparado ao seu grupo controle, sendo que nos animais $MuT^{-/-}$ ocorre um aumento bem acentuado desse parâmetro (Figura 20-E). Por fim, os animais $MuT^{-/-}$ tratados com DSS e que não recebeu mix de antimicrobianos apresenta translocação de bactérias para o fígado (Figura 20-F), algo não detectado nos animais WT que receberam DSS. O tratamento com antimicrobianos eliminou o aumento da população de enterobactérias e da translocação de bactérias para o fígado visto nos animais $MuT^{-/-}$ que receberam apenas DSS (Figuras 20-E e 20-F).

Em conjunto, esses dados demonstram que animais $MuT^{-/-}$ apresentam maior susceptibilidade à colite, disbiose acentuada e translocação de bactérias para o fígado, parâmetros revertidos pelo tratamento com antimicrobianos. Tais alterações ocorreram sem que houvesse agravamento da lesão tecidual nos animais $MuT^{-/-}$.

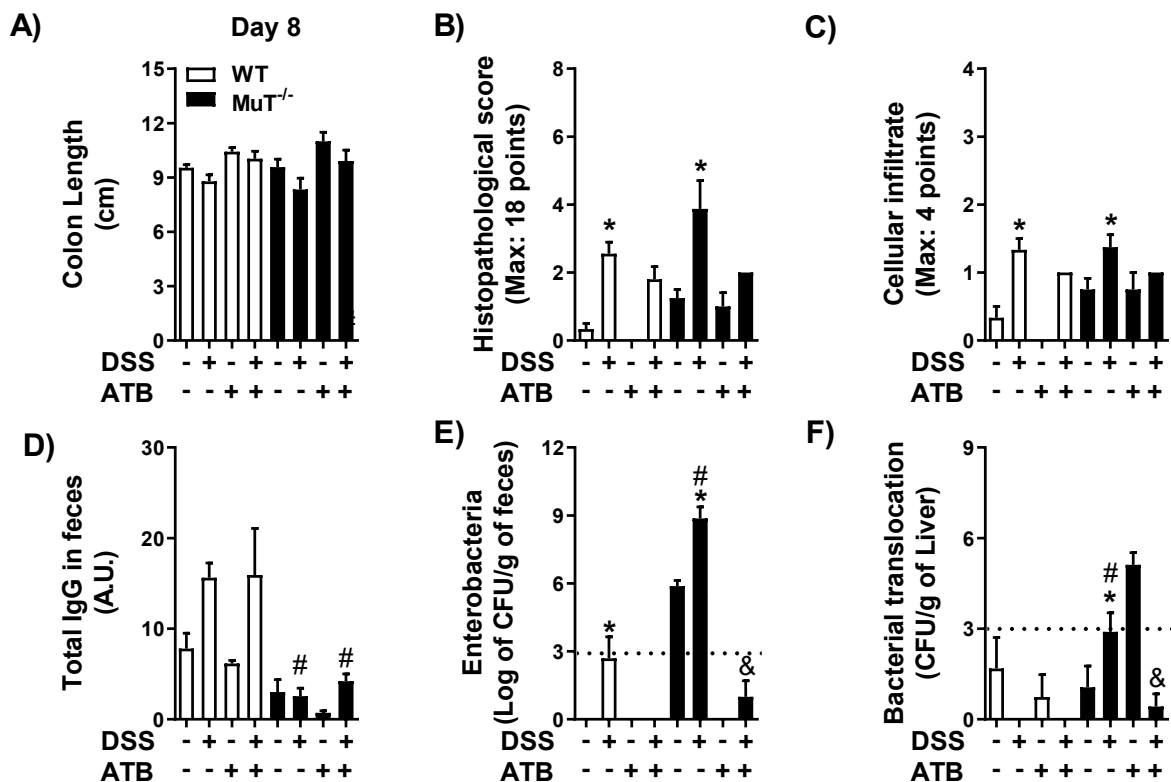


Figura 20: Tratamento de animais MuT^{-/-} submetidos a colite com mix de antimicrobianos reverte o fenótipo de susceptibilidade a doença e a translocação bacteriana para a circulação dos animais. Após a indução da colite por administração de DSS 2,5% p/v em água de beber por 8 dias, alguns animais foram tratados com mix de antibióticos a partir do quinto dia em água de beber até o momento da eutanásia realizado no oitavo dia do protocolo experimental. Foram coletadas amostras para avaliar o comprimento do cólon (A), o escore histopatológico (B), a quantificação de células infiltradas no cólon (C), a concentração de IgG total nas fezes (D) a contagem de enterobactérias nas fezes (E) e a translocação de bactérias para o fígado (F). As barras representam a média ± erro padrão. N=4-7 animais por grupo. *P<0,05 DSS Vs controle # P<0,05 camundongos MuT^{-/-} DSS Vs WT DSS e & P<0,05 MuT^{-/-} DSS + água Vs MuT^{-/-} DSS + ATB.

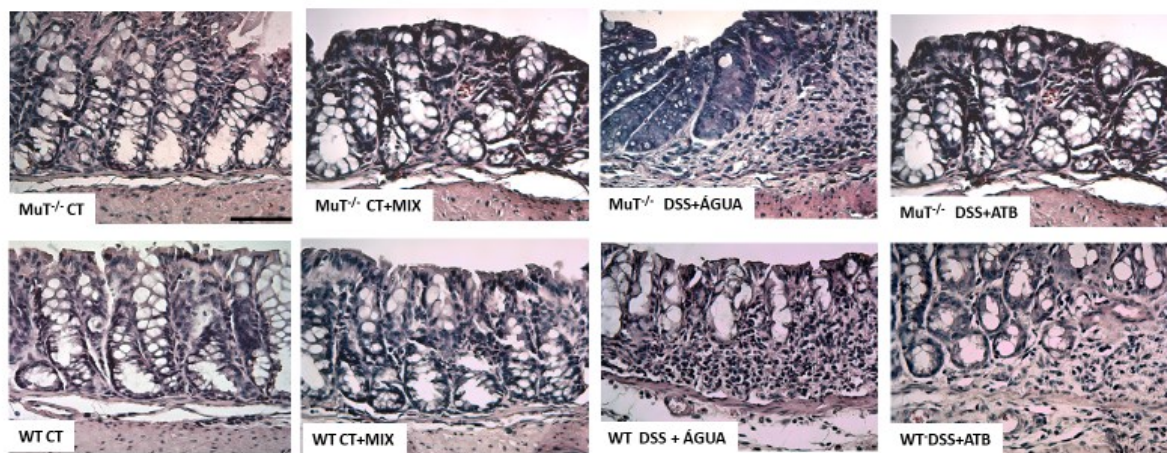


Figura 21: Alterações histopatológicas do cólon de animais submetidos a indução da colite ulcerativa. Após a indução da colite por administração de DSS 2,5% p/v em água de beber por 8 dias, alguns animais foram tratados com mix de antibióticos a partir do quinto dia em água de beber até o momento da eutanásia realizado no oitavo dia do protocolo experimental. Na eutanásia o cólon foi retirado para análise histopatológica por coloração por H&E. A barra, na prancha histológica, representa 100µm. As imagens são representativas de um experimento contendo 4 a 7 camundongos em cada grupo.

O próximo passo foi avaliar se a administração de anticorpos IgG provenientes de animais selvagens e previamente purificados seria capaz de reverter o fenótipo de susceptibilidade a colite dos animais MuT^{-/-}. Diante disso foi realizado outro experimento com indução de colite via DSS 2.5% e nos dias 3, 5 e 7 após o início da doença foi administrado por via intraperitoneal 1 mg de IgG por animal MuT^{-/-}. Esse experimento foi realizado com quatro grupos de animais, dois grupos com animais MuT^{-/-}, sendo um grupo controle e o outro que foi induzida a colite com DSS e que recebeu anticorpos IgG previamente purificados, e os outros dois grupos com

animais selvagens, sendo um grupo controle e o outro grupo com indução da colite com DSS 2,5%. Nesse experimento foi possível observar uma concentração de anticorpos IgG no soro dos animais MuT^{-/-} DSS+IgG semelhante àquela de animais WT, demonstrando assim que a administração de IgG aos animais por via intraperitoneal de fato levou ao aumento de IgG circulante nos animais MuT^{-/-} (Figura 22-A). Os animais MuT^{-/-} DSS, conforme esperado, apresentam uma perda de peso bastante acentuada quando comparados ao grupo controle e aos animais WT, porém os animais MuT^{-/-} DSS+IgG apresentaram reversão parcial desse fenótipo de perda acentuada de peso (Figura 22-B). Em relação ao escore clínico da doença (Figura 22-C) é possível observar uma piora clínica nos animais MuT^{-/-} DSS+ÁGUA quando comparados ao grupo MuT^{-/-} Controle, e a administração de IgG a esses animais melhorou significativamente o escore clínico da doença. Quando avaliado o total de IgG nas fezes (Figura 22-D), os animais MuT^{-/-} do grupo DSS+IgG apresentam valores bem semelhantes aos animais WT, embora não haja diferença estatística entre esses grupos. A indução da colite levou a um aumento bem acentuado da população de enterobactérias tanto nas fezes dos animais MuT^{-/-} DSS e dos MuT^{-/-} DSS+IgG quando comparados aos animais WT (Figura 22-E). Por fim, os animais MuT^{-/-} DSS+ÁGUA, como observados em outros experimentos, apresentaram translocação de bactérias para o fígado. Porém, de forma interessante, os animais MuT^{-/-} DSS+IgG não apresentaram translocação de bactérias para o fígado (Figura 22-F). Esse conjunto de resultados demonstram o papel da IgG para reverter o agravamento da doença e a translocação bacteriana para o fígado dos animais MuT^{-/-}.

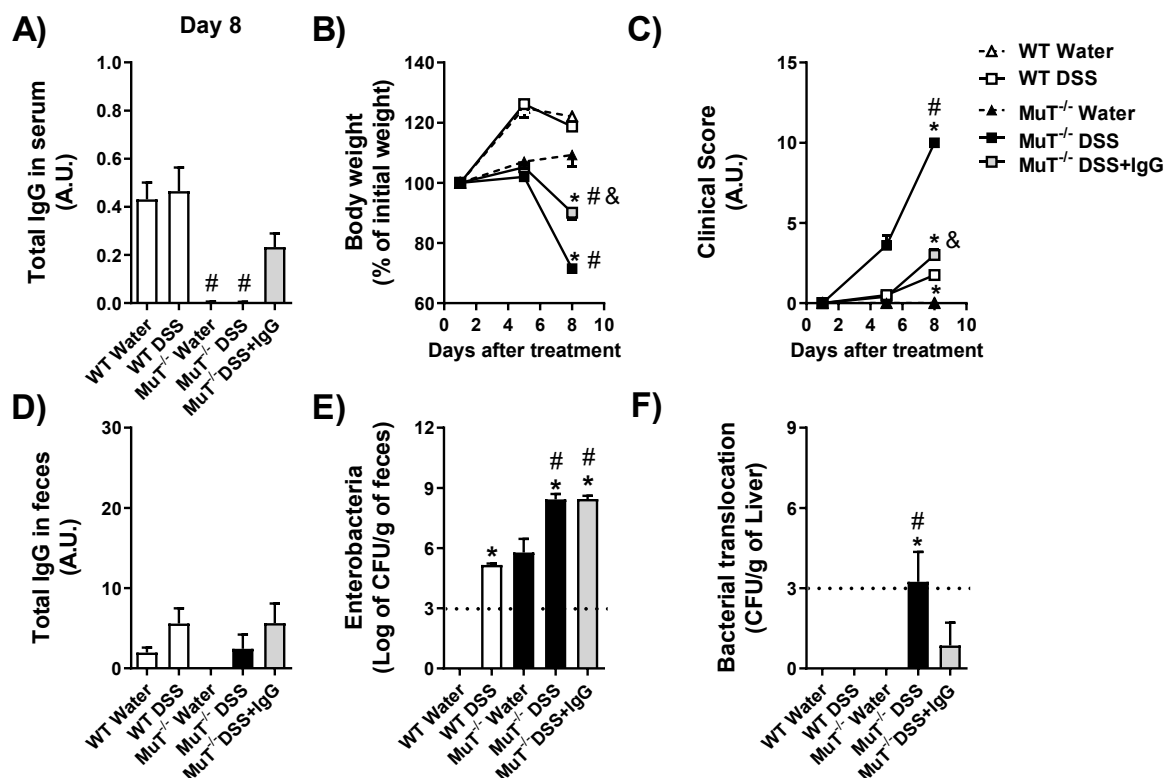


Figura 22: Administração de IgG provenientes de animais selvagens para animais $MuT^{-/-}$ reverte o fenótipo de susceptibilidade a colite ulcerativa. A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 2,5% em água de beber por 8 dias em camundongos $MuT^{-/-}$ e em camundongos C57BL6. Animais $MuT^{-/-}$ receberam injeção i.p com 1mg de anticorpo IgG previamente purificado proveniente de animais WT nos dias 3, 5 e 7 do protocolo experimental. Animais controle receberam apenas água. Os animais foram eutanasiados no D8 para coleta de tecidos e avaliação das concentrações de IgG total no soro (A), peso corporal (B), escore clínico da doença (C), IgG total nas fezes (D), conteúdo de enterobactérias nas fezes (E) e translocação bacteriana para o fígado (F). A linha tracejada em E e F significa limite de detecção. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. N= 4 a 7 animais por grupo. * $P < 0,05$ camundongos DSS Vs controle # $P < 0,05$ camundongos $MuT^{-/-}$ DSS Vs camundongos C57/Bl6 e & $P < 0,05$ camundongos $MuT^{-/-}$ DSS + água Vs camundongos $MuT^{-/-}$ DSS + IgG.

O receptor de IgG $Fc\gamma RIIB$, mas não o receptor $Fc\gamma RIII$, controla a susceptibilidade a colite por impedir a translocação da microbiota disbiótica:

Dado o papel protetor exercido por IgG durante a colite, estabelecido nas seções anteriores, buscamos entender qual seria o papel dos receptores de IgG nesse modelo de colite. Para isso, realizamos novos experimentos, porém desta vez com animais deficientes dos receptores de IgG, mais especificamente para os receptores de ativação (animais $Fc\gamma RIII$) e para os receptores de inibição (animais $Fc\gamma RIIB$). Como foi observado nos animais deficientes de IgG maior letalidade comparado aos animais WT, o primeiro dado avaliado nos animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e $Fc\gamma RIII^{-/-}$ foi a taxa de letalidade. Como observado na Figura 23-A, os animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$

apresentaram maior taxa de letalidade quando comparados com os animais WT e FcγRIII^{-/-} submetidos a colite. Os animais FcγRIIB^{-/-} também apresentaram perda de peso bem acentuada (Figura 23-B) e pior escore clínico (Figura 23-C) em comparação aos animais FcγRIII^{-/-} e WT que receberam DSS.

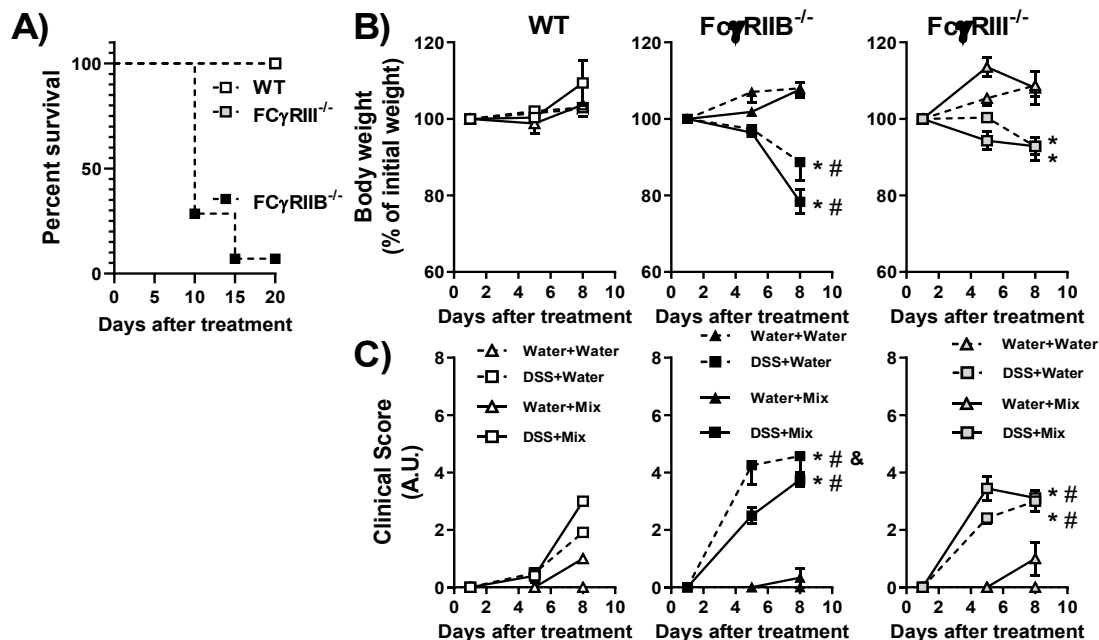


Figura 23: Animais deficientes do receptor FcγRIIB apresentam maior letalidade e doença mais grave após indução da colite ulcerativa quando comparado a animais FcγRIII^{-/-} e WT. Após a indução da colite por administração de DSS 2,5% p/v em água de beber por 8 dias, alguns animais foram tratados com mix de antibióticos a partir do quinto dia em água de beber até o momento da eutanásia realizado no oitavo dia do protocolo experimental. Os animais foram acompanhados ao longo do tempo para avaliação da taxa de letalidade (A) peso corporal (B) e escore clínico (C). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. N=4-6 animais por grupo. *P<0,05 animais DSS Vs animais controle # P<0,05 camundongos *Knockouts* DSS Vs camundongos C57Bl6 DSS e & P<0,05 camundongos FcγRIIB^{-/-} DSS + água Vs camundongos FcγRIIB^{-/-} DSS + ATB.

Na eutanásia dos animais deficientes dos receptores FcγRIIB^{-/-} e FcγRIII^{-/-} também foi retirado fígado, para avaliar a translocação bacteriana, cólon, para avaliar se haveria diferenças em relação ao comprimento e aos aspectos histológicos entre os grupos de animais e as fezes foram coletadas para avaliar a quantidade de enterobactérias e posteriormente realizar as análises de quantificação de IgG. Em relação ao comprimento do cólon (Figura 24-A), foi possível observar que os animais deficientes dos receptores FcγRIIB^{-/-} e FcγRIII^{-/-} que receberam DSS apresentam encurtamento do cólon quando comparados aos seus respectivos grupos controles. Porém o tratamento desses animais a partir do quinto dia com coquetel de antimicrobianos,

reverteu o fenótipo (Figura 24-A). Quando realizada a quantificação de IgG nas fezes nos animais nesse tempo do D8 não foi possível observar diferença estatística entre o grupo WT DSS e seu respectivo grupo controle, porém os animais os animais FcγRIIB submetidos a colite apresentaram maior concentração de IgG nas fezes (Figura 24-B). Ainda, os animais FcγRIIB^{-/-} e FcγRIII^{-/-} apresentaram quantidade de UFCs de enterobactérias bastante elevada quando comparado aos seus respectivos grupos controles (Figura 24-C). E de forma interessante, os animais FcγRIIB^{-/-} tratados com DSS apresentaram translocação de bactérias para o fígado (Figura 24-D), mas não os animais de outros genótipos que receberam DSS. Por fim, análises histológicas do cólon dos animais submetidos à colite revelaram que a lesão tecidual foi acentuada nos animais FcγRIIB^{-/-} quando comparada com aquela observada nos animais WT e FcγRIII^{-/-} submetidos ao mesmo protocolo experimental (Figura 25). Os animais FcγRIIB^{-/-} tratados com antimicrobianos apresentaram reversão em todos os parâmetros citados, exceto no aumento de IgG total nas fezes. Esse conjunto de resultados demonstra que o receptor de IgG FcγRIIB, mas não o receptor FcγRIII, controla a susceptibilidade a colite por impedir a translocação da microbiota disbiótica, além de apresentarem maior inflamação tecidual, eventos dependentes da microbiota disbiótica.

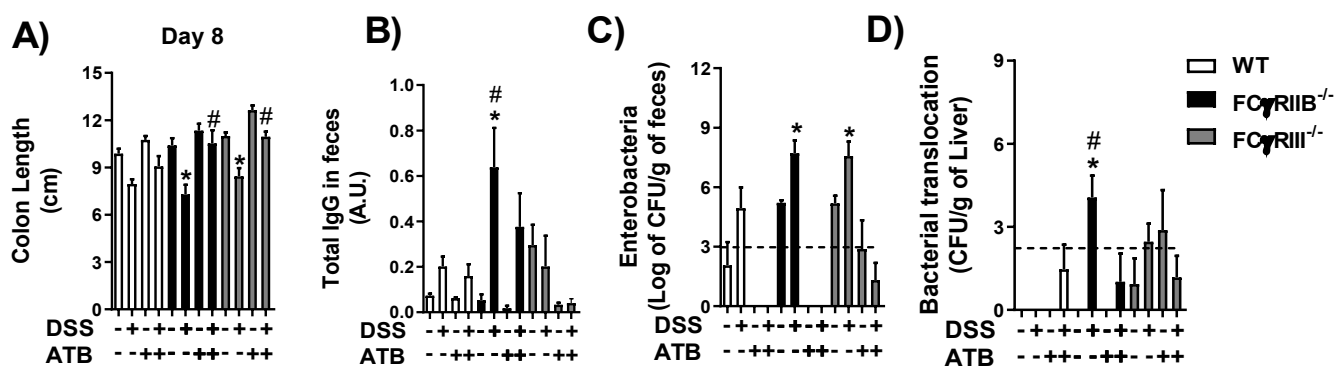


Figura 24: Animais FcγRIIB^{-/-} apresentam maior translocação bacteriana para o fígado em comparação aos animais WT e FcγRIII^{-/-}. Após a indução da colite por administração de DSS 2,5% p/v em água de beber por 8 dias em animais C57/Bl6, FcγRIIB^{-/-} e FcγRIII^{-/-}, alguns animais foram tratados com mix de antibióticos a partir do quinto dia em água de beber até o momento da eutanásia, realizada no oitavo dia do protocolo experimental. Foram então coletadas amostras para avaliação do comprimento do cólon (A) quantificação de IgG nas fezes (B), quantificação de enterobactérias nas fezes (C), e translocação de bactérias para o fígado (D). Os resultados estão expressos em média ±

erro padrão. N= 4-7 animais por grupo. *P<0,05 DSS Vs controle # P<0,05 camundongos FcyRIIB^{-/-} e FcyRIII^{-/-} DSS Vs WT DSS.

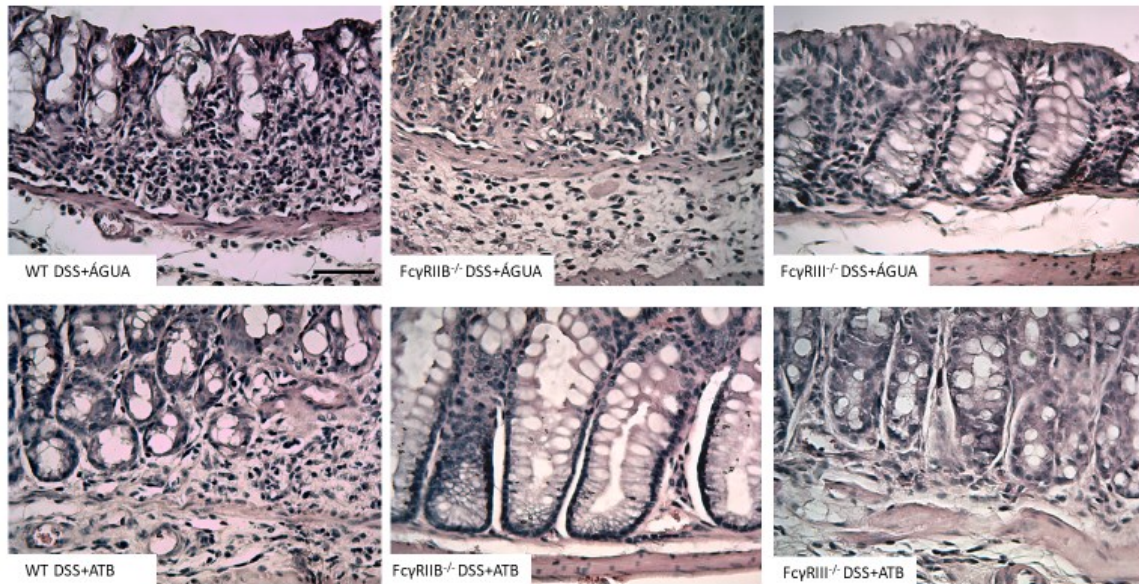


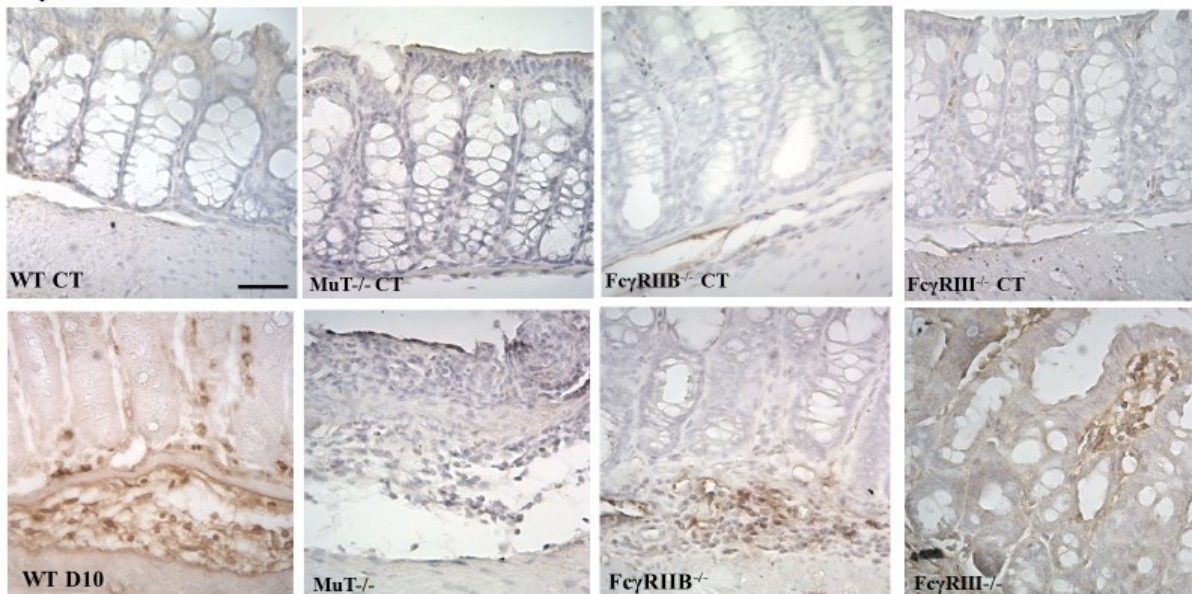
Figura 25: Alterações histopatológicas do cólon de animais submetidos a indução da colite ulcerativa e tratados com coquetel de antimicrobianos. Após a indução da colite por administração de DSS 2,5% p/v em água de beber por 8 dias em animais C57/Bl6, FcyRIIB^{-/-} e FcyRIII^{-/-}, alguns animais foram tratados com mix de antibióticos a partir do quinto dia em água de beber até o momento da eutanásia realizado no oitavo dia do protocolo experimental. Os animais foram eutanasiados e o cólon foi retirado para análise histopatológica por coloração por H&E. A barra, na prancha histológica, representa 100µm. As imagens são representativas de um experimento contendo 4 a 7 camundongos em cada grupo.

Ativação de FcyRIIB impede a expansão e translocação de bactérias disbióticas por controlar a expressão da enzima NOS2:

Como dito anteriormente, a colite ulcerativa é uma doença inflamatória idiopática, crônica e remittente do trato gastrointestinal e vários mediadores têm sido sugeridos como possíveis participantes na patogênese da resposta inflamatória. Entre esses mediadores, o óxido nítrico é um dos possíveis agentes etiológicos propostos no processo inflamatório da colite, inclusive alguns trabalhos na literatura apontam como evidências um aumento na produção de óxido nítrico e superexpressão de iNOS na mucosa do cólon de pacientes com doenças inflamatórias

intestinais, IBDs. Ainda, iNOS desempenha importante papel na promoção da expansão de enterobactérias no cólon inflamados. Sendo assim, nosso próximo passo foi avaliar se haveria alteração da expressão da enzima iNOS nos animais $\text{MuT}^{-/-}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIII}^{-/-}$ em relação aos animais WT após indução da colite. Para isso realizamos análise de imuno-histoquímica para marcação da enzima NOS2 no cólon dos animais WT, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}^{-/-}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ e $\text{MuT}^{-/-}$ após a indução da colite (Figura 26-A). Nossos dados demonstram que animais selvagens apresentam maior número de células marcadas para NOS2 apenas 10 dias após o início do protocolo experimental. Não houve incremento do número de células NOS2⁺ em animais $\text{MuT}^{-/-}$ 8 dias após o início do protocolo experimental, porém os animais $\text{Fc}\gamma\text{RIII}^{-/-}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$, apresentaram intensa marcação da enzima NOS2 no cólon, conforme as imagens da (Figura 26-A). Porém, apenas nos animais $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$, o número de células positivas para NOS2 foi maior em relação aos animais WT (Figura 26-B). Esses resultados indicam que $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ regula negativamente a expressão de NOS2 no cólon durante a colite ulcerativa.

A)



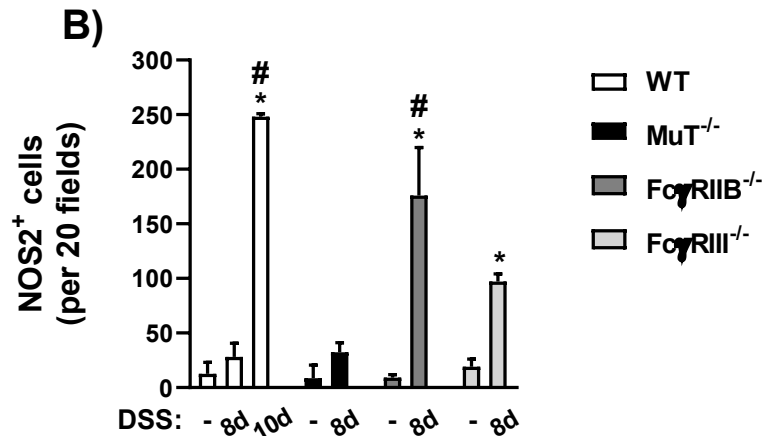


Figura 26: Animais FcγRIIB^{-/-} apresentam maior quantidade de células NOS2⁺ oito dias após indução da colite. Camundongos WT, MuT^{-/-}, FcγRIIB^{-/-} e FcγRIII^{-/-} foram submetidos ao protocolo de colite e o cólon foi coletado para análise da expressão da enzima NOS2 por imunohistoquímica. Em (A) Na primeira linha da prancha histológica está representado animais controles e na segunda linha temos representado os animais submetidos ao protocolo de colite. As imagens da prancha histológica são representativas de um experimento contendo 4 camundongos em cada grupo. A barra, na prancha histológica, representa 100μm. (B) A contagem de células NOS2⁺ foi feita em pelo menos 20 campos de cada corte histológico.

Diante do fenótipo de apresentar aumento de células NOS2⁺ observado nos animais FcγRIIB em comparação aos outros grupos de animais doentes, buscamos avaliar se o tratamento com aminoguanidina, inibidor da NOS2, poderia de alguma forma interferir na doença nesses animais. Para isso realizamos outro experimento com indução da colite em animais WT e animais FcγRIIB^{-/-}, porém a partir do terceiro dia do protocolo experimental, parte dos animais submetidos ao protocolo de colite passaram a receber em água de beber também aminoguanidina na concentração 1mg/ml até o dia da eutanásia dos animais. Após a indução da doença, os animais FcγRIIB^{-/-}, como no experimento anterior, foram mais susceptíveis a doença, apresentando perda do peso corporal e pior escore clínico quando comparado aos animais WT (Figura 27 A-B). O tratamento com aminoguanidina levou a uma melhora dos animais FcγRIIB^{-/-} doentes, e eles apresentaram menores perda de peso e escore clínico quando comparados ao grupo FcγRIIB^{-/-} DSS+ÁGUA.

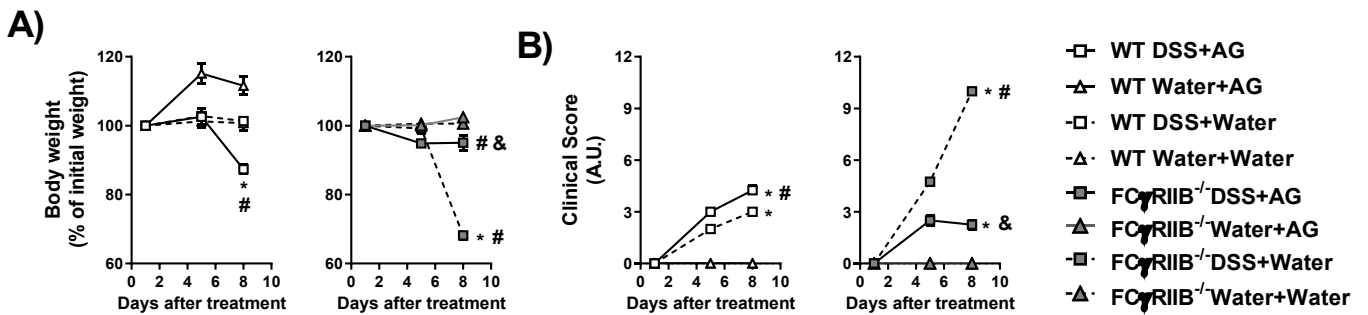


Figura 27: Tratamento dos animais FcγRIIB^{-/-} submetidos a colite com aminoguanidina melhora a doença: Após a indução da colite com DSS 2.5% p/v em água de beber por 8 dias os animais WT, FcγRIIB foram tratados ou não com 1mg/ml de aminoguanidina em água de beber a partir do terceiro dia do protocolo experimental até o momento da eutanásia. Os animais foram acompanhados ao longo do tempo para avaliação do peso corporal (A) e escore clínico (B). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. N=4-7 animais por grupo. *P<0,05 DSS Vs respectivo controle; # P<0,05 Vs WT DSS+Water; & P<0,05 Vs FcγRIIB^{-/-} DSS+Water

Nesse mesmo experimento realizado para avaliar se o tratamento com aminoguanidina poderia interferir na doença, o comprimento do cólon também foi avaliado entre os grupos (Figura 28-A). Os animais FcγRIIB^{-/-} submetidos a colite que não foram tratados com aminoguanidina, apresentaram encurtamento do cólon comparados aos seus respectivos controles. O tratamento com aminoguanidina não interferiu no comprimento do cólon dos animais WT DSS, ao passo que houve redução do encurtamento do cólon de animais FcγRIIB^{-/-} tratados com DSS. O tratamento com aminoguanidina não interferiu na expansão de enterobactérias após a indução da colite nos animais WT (Figura 28-B). Porém, nos animais FcγRIIB^{-/-} com colite, o tratamento com aminoguanidina inibiu totalmente a expansão de enterobactérias nas fezes. Ao avaliarmos a translocação bacteriana para o fígado dos animais (Figura 28-C), observamos que o tratamento com aminoguanidina não fez qualquer efeito nos animais WT. Porém, nos animais FcγRIIB^{-/-} submetidos a colite e tratados com aminoguanidina houve redução na translocação de bactérias para o fígado. Esse conjunto de resultados demonstra que o tratamento dos animais submetidos a colite com aminoguanidina pode reduzir a morbidade observada nos animais FcγRIIB^{-/-}, impedir a expansão de enterobactérias e consequentemente impedir a translocação de bactérias para o fígado dos animais FcγRIIB^{-/-}.

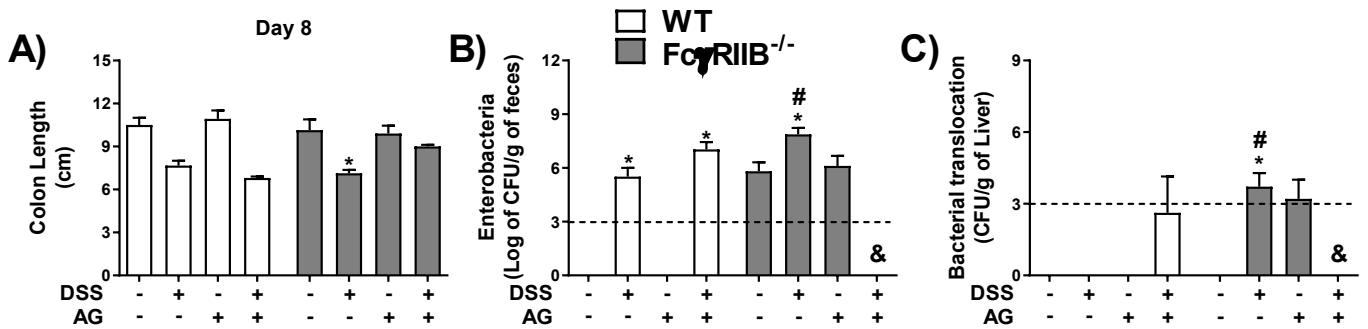


Figura 28: Tratamento de animais submetidos a colite com aminoguanidina impediu expansão de enterobactérias e translocação de bactérias para a circulação em animais FcγRIIB^{-/-}. A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 2.5% em água de beber por 8 dias em camundongos C57Bl6 e camundongos FcγRIIB^{-/-}. Animais foram tratados com aminoguanidina a partir do terceiro dia após a indução da doença. Animais controle receberam apenas água. Os animais foram avaliados em relação ao comprimento do cólon (A), quantificação de enterobactérias nas fezes (B), e translocação de bactérias para o fígado (C). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. Resultados obtidos de experimento com n=4-12 animais. *P<0,05 DSS Vs respectivo controle; # P<0,05 Vs WT DSS+Water; & P<0,05 Vs FcγRIIB^{-/-} DSS+Water

DISCUSSÃO:

Nesse trabalho foi observado que a colite ulcerativa induzida pelo DSS é caracterizada por um desequilíbrio da homeostase intestinal, causando a disbiose da microbiota e, após consecutivos experimentos, foi observado que a expansão de enterobactérias nas fezes, que neste trabalho foi utilizado para sinalizar a disbiose, era também acompanhada por maiores concentrações de IgG nas fezes. Visto que a disbiose era mais duradoura do que a própria colite, o que os dados sugerem é que o aumento da concentração de IgG é dependente da microbiota disbiótica, pois ao tratar os animais com coquetel de antimicrobianos se tem a inibição do aumento de IgG nas fezes.

Estudos realizados ao longo das últimas duas décadas, utilizando técnicas mais avançadas de análise da microbiota, como por exemplo a metagenômica, demonstraram que em um indivíduo adulto, uma microbiota saudável é caracterizada pela predominância de bactérias anaeróbias obrigatórias, representantes dos dois grandes filos que compõe a microbiota intestinal, Firmicutes e Bacteroidetes, e pela presença, em menor quantidade, de membros dos filos Actinobacteria, Fusobacteria e Proteobacteria, que são, portanto, caracterizados como subdominantes na microbiota intestinal.¹⁹ Mudanças na composição da microbiota, já anteriormente descritas como disbiose, estão associadas com inúmeras doenças, dentre elas as doenças inflamatórias intestinais. Dentre as doenças inflamatórias intestinais a colite ulcerativa é uma das principais representantes. Uma das principais características da colite ulcerativa induzida pelo DSS conforme realizado nesse trabalho é o aumento relativo da quantidade de representantes do filo Proteobacteria, entre eles, as enterobactérias. Na literatura alguns trabalhos já consolidaram que uma das principais características da microbiota disbiótica é uma diminuição da diversidade de bactérias representantes dos filos Firmicutes e Bacteroidetes e uma expansão de bactérias representantes dos filos das Proteobacterias. Alguns pesquisadores, inclusive, sugerem que essa expansão de bactérias representante do filo das Proteobacterias seria uma assinatura da microbiota disbiótica (SHIN *et al.* 2015). E dentro dessa “assinatura da disbiose” a expansão de representantes da família das *Enterobacteriaceae*, pertencente ao filo Proteobacteria, já está bem estabelecido na literatura como um frequente marcador da disbiose (LITVAK Y, *et al.*,2017). Esse parece ser o caso também da disbiose associada à colite ulcerativa. De fato, alguns trabalhos relatam a expansão do conteúdo de enterobactérias nas fezes de indivíduos acometidos por IBD quando comparado com indivíduos saudáveis (BUTTÓ LF, *et al.* 2015). Assim, no presente trabalho também utilizamos o aumento do

conteúdo de enterobactérias para caracterizarmos a disbiose ao longo do modelo de colite ulcerativa. Um dado interessante que foi observado até o momento foi que a disbiose parece ser mais duradoura que a própria doença. Ainda, as alterações histopatológicas no cólon parecem ter duração semelhante à duração da disbiose, o que suporta a ideia que a disbiose pode ser preponderante para a manutenção da lesão tecidual. Estudos experimentais e clínicos demonstrando que o uso de antimicrobianos resultam no controle da colite vão ao encontro de tal premissa. Nossos resultados envolvendo a administração de antimicrobianos, ainda que incipientes, reforçam essa premissa, já que não houve encurtamento do cólon no grupo que recebeu DSS e o mix de antimicrobianos. Análises subsequentes desses nossos experimentos envolvendo a administração de um coquetel de antimicrobianos aos animais que receberam DSS poderão corroborar em mais detalhe essa hipótese. Em resumo, a disbiose associada à administração de DSS interrompe a homeostase intestinal, causando uma inflamação duradoura da mucosa do cólon e quebra da barreira epitelial intestinal, o que parece levar a uma translocação de antígenos bacterianos para outros sítios do organismo.

Muitos trabalhos na literatura tratam do papel da IgA como uma das alternativas de proteção do epitélio intestinal frente a insultos diversos. Uma das primeiras evidências que sugerem que pode haver uma imunomodulação mediada por anticorpos foi publicado por Fagarasan *et al.* Nesse trabalho foram utilizados animais deficientes do gene *Aicda* (do inglês *activation induced cytidine deaminase* - citidina desaminase induzida por ativação), o que impede a troca de isotipos das imunoglobulinas para IgA. Nesse estudo os autores demonstraram que esses animais sofreram uma hiperplasia linfoide grave e isso foi associado com expansão de membros anaeróbicos da microbiota. Resultado similar foi observado em outro estudo onde os autores utilizaram animais *RAG2^{-/-}*, deficientes de linfócitos, e observaram o mesmo padrão de expansão de bactérias anaeróbicas do estudo anterior. Esses estudos, em conjunto com outros, demonstram a importância da imunoglobulina A no controle da composição da microbiota do hospedeiro. Dado o papel importante da IgA no controle da composição da microbiota, também monitoramos no nosso trabalho a quantidade de IgA no lúmen do cólon após a indução da colite. De forma interessante, observamos que não houve diferença marcante na quantidade de IgA total ao longo de todo o período avaliado. Entretanto, houve variação da deposição de IgA em bactérias luminais ou fecais apenas 60 dias após o início do protocolo experimental. Em contrapartida, as concentrações de IgG nas fezes aumentou drasticamente após a indução da colite. Parte dessa IgG presente no lúmen intestinal é reativa a antígenos de bactérias fecais e de isolados obtidos durante a disbiose. Importaneamente, durante a disbiose, há aumento da

proporção de bactérias ligadas a IgG. Inclusive, um ponto interessante observado nesse trabalho é que a partir do momento em que se observava uma maior quantidade de IgG reativo a antígenos de bactérias da microbiota disbiótica, passava-se a ter o início da resolução da disbiose, conforme avaliado pela redução do conteúdo de enterobactérias. Em conjunto, esses dados sugerem que IgGs podem também desempenhar um papel durante a disbiose associada à colite ulcerativa.

De forma geral, nossos dados demonstram até aqui uma combinação de eventos, entre a disbiose que se inicia 5 dias a partir da indução da colite ulcerativa, com pico no dia 10, a lesão tecidual e o aumento das concentrações de IgG, no conteúdo luminal, e sua ligação a bactérias luminiais, que é acentuado principalmente 15 dias após a indução da colite. A partir desse momento, interessantemente, passa-se a observar a resolução da disbiose e da lesão tecidual. Importaneamente, a disbiose parece induzir um aumento nas concentrações de IgG no lúmen porque em animais tratados com um coquetel de antimicrobianos, iniciado 5 dias após a indução da colite até a eutanásia dos animais, há inibição dessa resposta de IgG. Assim, os achados suportam a ideia que o aumento da concentração de IgG no lúmen após a colite é dependente da disbiose e pode estar envolvido no controle da mesma.

A imunoglobulina G é o principal isotipo de anticorpo encontrado no sangue e em fluidos extracelulares, inclusive já se tem demonstrado na literatura que IgG se liga a bactérias e podem eliminar essas bactérias por fagócitos via receptor Fc-gama ou pode desencadear a ativação do sistema complemento que pode resultar na lise da bactéria, ou por deposição de fragmentos do complemento em sua superfície, seguido de reconhecimento mediado por receptores de complemento na superfície de células fagocitárias, resultando também na eliminação da bactéria. Definir os mecanismos pelos quais IgGs podem proteger contra a disbiose associada à colite é fundamental. Em um artigo publicado por um grupo de pesquisadores da Universidade de Cambridge, foi demonstrado que a imunidade via anticorpo mediado pela ativação do sistema complemento teve papel essencial na resistência do hospedeiro na infecção por *Salmonella enterica*. Já no trabalho de Kamada e colaboradores, os autores demonstram que há indução de IgG contra fatores de virulência expressos pelo *Citrobacter rodentium* que é utilizado em modelos para simular a infecção por *Escherichia coli* entero-hemorrágica. Segundo os achados dos pesquisadores, a expressão do fator de virulência (LEE) é controlada 12 dias após a infecção, que é coincidente com o tempo onde há redução de respostas específicas de IgG contra o patógeno *Citrobacter rodentium*. Um ponto interessante que os autores identificaram nesse trabalho foi que IgG ligado à bactéria aumentava a eliminação por

fagócitos via opsonização, e através de análise de citometria de fluxo eles identificaram que havia uma maior expressão de marcadores de neutrófilos do que marcadores de macrófagos nesses animais, sugerindo que os neutrófilos estivessem envolvidos nessa resposta de eliminação. Essa resposta era dependente de receptores $Fc\gamma$, porque ao utilizar animais deficientes desses receptores os animais foram mais susceptíveis a doença quando comparado aos animais selvagens.

Cientes da importância de IgG para controlar a bacteremia e a translocação de bactéria para a circulação como demonstrado na literatura e como nesse trabalho observamos que IgG é induzido pela microbiota disbiótica, nosso próximo passo foi avaliar como seria o fenótipo da doença em animais $MuT^{-/-}$ que são animais deficientes de linfócito B, logo incapazes de produzir qualquer tipo de isótipo de anticorpo, incluindo o isótipo IgG, foco desse trabalho. Após iniciarmos os primeiros experimentos com os animais $MuT^{-/-}$, já foi possível observar uma diferença bem clara de fenótipo na manifestação da doença entre os animais $MuT^{-/-}$ e WT, pois animais $MuT^{-/-}$ apresentavam uma susceptibilidade acentuada à doença e grande parte dos animais sucumbiam antes do dia 10 do protocolo experimental. Diante desse fenótipo de susceptibilidade dos animais $MuT^{-/-}$, optamos por avaliar sempre no dia 8, para podermos avaliar as possíveis alterações que a indução da colite causava e podermos coletarmos todos os órgãos necessários para as análises futuras antes de perder o animal para a doença. A escolha do Dia 8 foi importante para analisarmos os parâmetros da doença nos animais $MuT^{-/-}$, porém, neste momento os animais WT ainda não apresentam aumento expressivo de IgG nas fezes, por exemplo. Após observarmos que animais $MuT^{-/-}$ eram mais susceptíveis a doença, apresentando perda de peso e pior escore clínico em comparação aos animais WT, também foi possível observar maior expansão de enterobactéria nas fezes. Por fim, quando os animais apresentavam maior expansão de enterobactérias nas fezes também era possível observar maior translocação de bactérias para o fígado dos animais doentes. De maneira importante, essa resposta era dependente da microbiota disbiótica, pois animais $MuT^{-/-}$ submetidos ao protocolo de colite e que receberam mix de antimicrobianos, apresentaram abrandamento da doença, menor lesão tecidual, diminuição na expansão de enterobactérias nas fezes e, de forma interessante, não houve translocação de bactérias para o fígado dos animais. Assim, podemos concluir que a maior susceptibilidade dos animais $MuT^{-/-}$ ao modelo de colite ulcerativa é dependente da microbiota disbiótica.

Diante desse fenótipo observado nos animais $MuT^{-/-}$, fomos avaliar se de fato pudesse ser a ausência de IgG nos animais $MuT^{-/-}$ que poderia estar envolvida nesse fenótipo de

susceptibilidade dos animais, e se a maior expansão de enterobactérias e translocação de bactérias para o lúmen poderia influenciar esse perfil de susceptibilidade a doença que foi observado de forma recorrente nos animais. Para tentar entender se o fenótipo de susceptibilidade observado nos animais $MuT^{-/-}$ poderia estar relacionado com a ausência de IgG, realizamos outro experimento onde administramos IgG previamente purificados do soro de animais WT para os animais $MuT^{-/-}$ e foi possível observar que os animais que foram submetidos ao protocolo de colite e que receberam IgG via i.p responderam de forma mais branda a doença, perderam menos peso, e o escore clínico ficou semelhante aos animais WT, e de forma interessante não houve translocação de bactérias para o fígado dos animais $MuT^{-/-}$ e os animais não sucumbiram a doença. Apesar de todos esses efeitos, a administração de IgG não interferiu na expansão de enterobactérias nas fezes. Esse conjunto de dados sugere que na ausência de anticorpos IgG, os animais possuem mais enterobactérias e a expansão de enterobactérias nas fezes parece levar a translocação de bactérias para o fígado, ocasionando assim a susceptibilidade no animal $MuT^{-/-}$. Assim, fica demonstrado que IgG consegue controlar a susceptibilidade dos animais a doença por impedir a translocação de bactérias para a circulação sanguínea.

Dada a importância de IgG observada para controlar a disbiose e conter a translocação de bactérias para o fígado, evitando assim a susceptibilidade dos animais a doença, o nosso próximo passo foi avaliar o papel dos receptores de IgG durante a disbiose induzida pela colite. Para isso utilizamos animais deficientes do receptor de inibição ($Fc\gamma RIIB$) e do receptor de ativação ($Fc\gamma RIII$). Curiosamente, um dado observado nesse trabalho foi que o receptor $Fc\gamma RIII$ parece ter papel marginal nesse modelo, pois a ausência do receptor de ativação de IgG não mudou substancialmente a forma com que o animal respondeu aos estímulos do DSS. De fato, animais $Fc\gamma RIII^{-/-}$ não apresentaram susceptibilidade marcadamente acentuada a doença e responderam a indução da colite de forma semelhante aos animais WT. Porém a ausência do receptor de inibição $Fc\gamma RIIB$ tornou os animais mais susceptíveis a doença. Esses animais a partir do quinto dia após indução da doença, apresentavam redução acentuada no peso corporal, com escore clínico mais elevado, lesão tecidual mais grave, expansão acentuada de enterobactérias nas fezes, e translocação de bactérias para o fígado. De forma importante, o tratamento com antimicrobianos reverteu todos esses fenótipos, demonstrando assim que a susceptibilidade a doença em animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ pode ser consequência da lesão tecidual mais acentuada causada pela microbiota disbiótica e translocação de bactérias disbióticas para o fígado.

Diante dos resultados obtidos após realizarmos os experimentos com animais $\text{MuT}^{-/-}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ buscamos entender de que forma a ausência de anticorpos e do receptor de inibição de $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ poderia afetar tanto os animais levando-os a apresentar tamanha susceptibilidade à doença. E como a colite é uma doença inflamatória idiopática, crônica e remitte do trato gastrointestinal e na literatura alguns mediadores têm sido sugeridos como possíveis participantes na patogênese da resposta inflamatória. Entre esses mediadores, o óxido nítrico é um dos possíveis agentes etiológicos propostos no processo inflamatório da colite, inclusive alguns trabalhos na literatura apontam como evidências um aumento na produção de óxido nítrico e superexpressão de iNOS na mucosa do cólon de pacientes com doenças inflamatórias intestinais, IBDS (LJUNG T, *et al.* 2006; KAMALIAN A, *et al.* 2020). Diante desses dados achados na literatura fomos avaliar se haveria expressão da enzima iNOS no cólon de animais WT, $\text{MuT}^{-/-}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIII}^{-/-}$. De fato, foi encontrado um número alto de células iNOS⁺ no cólon dos animais WT 10 dias após a indução da colite. Diante desse fenótipo esperávamos que os animais $\text{MuT}^{-/-}$ apresentariam número maior de células iNOS⁺, porém não foi esse o fenótipo encontrado: as células inflamatórias encontradas no cólon não expressavam NOS2. Nos animais $\text{Fc}\gamma\text{RIII}^{-/-}$ foi possível observar que houve marcação de NOS2 no cólon inflamado, porém sem significância estatística em relação aos animais WT com colite. Em contrapartida, os animais $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$, já no oitavo dia após a indução da colite, apresentavam um número maior de células positivas para NOS2 comparado aos animais WT, sugerindo um possível papel do receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ de regular negativamente a expressão de NOS2 no cólon dos animais durante a colite ulcerativa. Para avaliar se a expressão aumentada de NOS2 no cólon dos animais $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ poderia interferir no fenótipo dos animais, tratamos animais $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ e WT com aminoguanidina, que é um inibidor da enzima NOS2. Nos animais WT submetidos a colite o tratamento com aminoguanidina não influenciou na doença, consistente com a ausência de aumento da expressão da enzima durante a colite nesse grupo. Porém e de forma interessante, o tratamento de animais $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ a partir do terceiro dia após a indução da doença com aminoguanidina reduziu significativamente a morbidade observada nos animais. Os animais $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ tratados com aminoguanidina apresentaram redução do escore clínico da doença, menor encurtamento do cólon, inibição da expansão de enterobactérias nas fezes e não apresentaram translocação de bactérias para o fígado, demonstrando assim que o tratamento com aminoguanidina por inibir a enzima NOS2 nos animais $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$ atenua a expansão de enterobactérias e consequentemente a translocação de enterobactérias para o fígado dos animais, reduzindo assim a morbidade observada nesses animais.

Diante do conjunto de resultados apresentados nesse trabalho foi possível observar o papel importante de IgG em animais WT de controlar a composição e a atividade da microbiota disbiótica durante a colite ulcerativa. Entretanto a atividade excessiva de IgG pode ser prejudicial ao hospedeiro e de fato parece ser o que aconteceu nos animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$: após a indução da doença, é possível observar aumento expressivo de IgG no lúmen de animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$, e o aumento excessivo de IgG parece trazer consigo consequências que podem não ser tão benéficas para o hospedeiro. Inclusive, em um trabalho encontrado na literatura, o autor discute o papel ambíguo que pode ter a molécula de anticorpo, dependendo da ativação de imunoreceptores (DAËRON M. 2014). Nesse trabalho o autor deixa claro que apesar dos anticorpos serem as moléculas efetoras mais abundantes de respostas imunes adaptativas, pois de fato, protegem de doenças infecciosas, sendo responsáveis pela proteção de longo prazo conferida pelas vacinas e cada vez mais utilizados para imunoterapia passiva, os anticorpos também são responsáveis por doenças, incluindo alergias, anemia hemolítica do recém-nascido e várias doenças autoimunes. Nesse trabalho o autor se questiona como os anticorpos podem exercer ambos efeitos, por hora protetores, outrora patogênicos. E um fato importante nessa resposta é que, por si só, os anticorpos não exercem efeitos biológicos. Pois é necessário o anticorpo ligar especificamente ao antígeno e, assim, gerar complexos imunes, mas a ligação por si só não faz nada ou faz muito pouco ao antígeno. Para que os anticorpos afetem os antígenos, eles realmente precisam se ligar aos epítomos do antígeno através de suas porções Fab e também precisam interagir por meio de sua porção Fc com sistemas efetores, como por exemplo, células que expressam receptores para a porção Fc dos anticorpos (FcRs). Como os FcRs podem disparar sinais positivos e negativos, os anticorpos podem exercer amplo espectro de atividades biológicas, porém os anticorpos podem desencadear a liberação de substâncias potencialmente prejudiciais como mediadores inflamatórios e também podem induzir mecanismos citotóxicos, sendo, portanto, potencialmente patogênicos e este pode ser o preço a se pagar por ter anticorpos eficientes na imunidade protetora. Como as propriedades de ativação dos anticorpos são rigidamente controladas por mecanismos reguladores, as respostas imunológicas são normalmente não patogênicas e, apesar dos anticorpos aparecerem como moléculas efetoras potentes, eles não são "marcadores mágicos" como às vezes demonstrados.

Em outro trabalho publicado na literatura os autores demonstram que uma alteração genética observada no receptor de ativação em pacientes com doenças inflamatórias intestinais resulta em uma baixa afinidade de ligação para IgG, essa alteração genética em $Fc\gamma RIIA-R131$ foi protetora na colite ulcerativa, sugerindo que IgG pode desempenhar um papel patogênico na

inflamação intestinal. Nesse trabalho eles demonstram que IgG anti-bactérias comensais está associada à magnitude da inflamação intestinal, pois as amostras com níveis mais elevados de comensais ligados a IgG foram encontradas em pacientes com colite mais grave, sugerindo que IgG ligado em microrganismos comensais favorece a inflamação intestinal (CASTRO-DOPICO T, *et al.* 2019).

De fato a presença dos dois receptores de IgG, tanto de ativação, quanto de inibição, parece ser importante para controlar a doença e não exacerbar a resposta do hospedeiro frente a doença, pois como demonstrando os animais FcγRIIB^{-/-} foram bastante susceptíveis a doença e sucumbiram antes do D10. A presença do receptor de inibição FcγRIIB^{-/-} parece ser fundamental para controlar a resposta de anticorpos frente a microbiota disbiótica sem trazer malefícios ao hospedeiro, pois como demonstrado nesse trabalho os animais FcγRIIB^{-/-} após indução da doença, apresentaram expansão acentuada de enterobactérias nas fezes e devido à ausência do receptor de inibição a microbiota disbiótica leva a indução de muitos anticorpos para tentar conter essa alteração da composição da microbiota, e a lesão tecidual resultante da microbiota disbiótica atrai para o cólon um batalhão de células para fazer o reparo, dentre as células que migram para o lúmen podemos citar principalmente os neutrófilos. Embora os neutrófilos sejam muito importantes para o reparo, eles também podem trazer consequências para o hospedeiro como por exemplo, a liberação de conteúdos tóxicos dos seus grânulos, como espécies reativas de oxigênio e proteases. Esses produtos são altamente potentes e não discriminam entre alvos microbianos e células lesadas ou outras células do hospedeiro. Dessa forma, o dano ao tecido do hospedeiro é muitas vezes inevitável.

O recrutamento de neutrófilos para o cólon dos animais doentes pode trazer algumas consequências pois os grânulos presentes nos neutrófilos são tóxicos e podem causar a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), dentre elas, a produção de óxido nítrico mediada por iNOS. O óxido nítrico se transforma em nitrato no lúmen intestinal e, quando isso acontece, favorece a expansão de enterobactérias, pois algumas enterobactérias conseguem utilizar o nitrato como aceptor final de elétrons na respiração anaeróbia para gerar energia. Inclusive, no trabalho de (WINTER SE, *et al.* 2013) foi demonstrado que o nitrato gerado como um subproduto da resposta inflamatória do hospedeiro conferiu vantagem de crescimento para a bactéria comensal *Escherichia coli* no cólon de camundongos submetidos a colite e camundongos iNOS^{-/-} não suportaram o crescimento de *E. coli* pela respiração de nitrato, sugerindo que o nitrato gerado durante a inflamação foi derivado do hospedeiro e que é a própria resposta inflamatória do hospedeiro

que aumenta seletivamente o crescimento de *Enterobacteriaceae* comensais, pela habilidade que essa família de bactérias tem de utilizar o nitrato como aceptor final de elétrons para geração de energia. Uma pergunta a ser respondida é se a expansão de enterobactérias por nitrato pode favorecer a indução de fatores de virulência nessas bactérias, aumentando a habilidade de translocação para o fígado dos animais doentes.

Assim, nesse trabalho foi possível observar que IgG pode ter papel duplo na forma como o hospedeiro responde a colite induzida pelo DSS, pois em animais WT e MuT^{-/-} foi possível observar o papel protetor do anticorpo, pois em animais WT, a indução de anticorpos IgG pela microbiota disbiótica parece controlar a composição da microbiota de forma tardia, como demonstrado nos resultados no dia 15 do protocolo experimental, e em animais MuT^{-/-}, a ausência de anticorpos IgG dificulta o controle da translocação de bactérias para o fígado dos animais, causando a morte dos mesmos. Porém, o excesso da atividade de anticorpos IgG observado em animais FcγRIIB^{-/-} é prejudicial ao hospedeiro, pois nesses animais o aumento nas concentrações de IgG devido a expansão de enterobactérias nas fezes não é controlado devido a ausência do receptor de inibição, e o aumento excessivo de IgG atrai mais neutrófilos para o tecido, os neutrófilos medeiam a produção de óxido nítrico, que se transforma em nitrato e o aumento da disponibilidade de nitrato no lúmen beneficia diretamente membros da família *Enterobacteriaceae* que possuem vantagem metabólica em relação a outros grupos por utilizar o nitrato como aceptor final de elétrons para gerar energia e com isso expandem e translocam para o fígado causando a morte do animal FcγRIIB^{-/-}.

Resumidamente no presente trabalho demonstramos que a susceptibilidade dos animais com deficiência na expressão de FcγRIIB foi associada a alteração na expressão da enzima NOS2. E o tratamento com aminoguanidina, inibidor de NOS2 impediu a expansão de enterobactérias e a consequente translocação de bactérias para a circulação nesses animais. Em conclusão, esses dados permitem sugerir que a produção de IgG pelo hospedeiro inibe a translocação de enterobactérias para a circulação sanguínea após a disbiose, em parte, por inibir a produção de óxido nítrico mediada por NOS2 em um mecanismo envolvendo a ativação do receptor FcγRIIB.

REFERÊNCIAS

ACTIS GC, PELLICANO R. The pathologic galaxy modulating the genotype and phenotype of inflammatory bowel disease: comorbidity, contiguity, and genetic and epigenetic factors. **Minerva Medica**. 2016 Dec;107(6):401-412. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27314869/>>.

ARTIS D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Review Immunology**. 2008;8(6):411-20. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18469830/>>.

ATARASHI K, *et al.* Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. **Cell**. 2015 Oct 8;163(2):367-80. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26411289/>>.

AVDAGIĆ N, *et al.* Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease. **Bosnian Journal of Basic Medical Science** 2013; 13: 5-9. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23448603/>>.

BALAGAM B, RICHARDSON DE. The mechanism of carbon dioxide catalysis in the hydrogen peroxide N-oxidation of amines. **Inorganic Chemistry**. Feb 4.2008 47:1173. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18179203/>>.

BÄUMLER AJ, SPERANDIO V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**. 2016 Jul 7;535(7610):85-93. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27383983/>>.

BEN MKADDEM S, *et al.* Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. **Frontiers in Immunology**. 2019 Apr 12;10:811. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00811/full>>.

BERGSTROM KS, *et al.* Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. **PLoS Pathogens**. 2010 May 13;6(5):e1000902. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000902>>.

BEVINS CL, SALZMAN NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature Review Microbiology**. 2011 May;9(5):356-68. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21423246/>>.

BOURNAZOS S, *et al.* The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. **Nature Review Immunology**. 2020 Oct;20(10):633-643. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32782358/>>.

BOURNAZOS S, RAVETCH JV. Fcγ Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies. **Immunity**. 2017 Aug 15;47(2):224-233. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5573140/>>.

BOURNAZOS S, RAVETCH JV. Fcγ receptor pathways during active and passive immunization. **Immunology Review**. 2015 Nov;268(1):88-103. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26497515/>>.

BRITO BC. Dissertação de mestrado Programa de Pós-Graduação em microbiologia UFMG. Novembro de 2017.

BROWN, E. M., M. SADARANGANI, B. FINLAY. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. **Nature Immunology**.v.14, n.7, p. 660-7. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23778793/>>.

BUNKER JJ, *et al.* Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. **Science**. 2017 Oct 20;358(6361). Disponível em:<<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aan6619?iss=6361&>>.

BUTTÓ LF, *et al.* Mechanisms of Microbe-Host Interaction in Crohn's Disease: Dysbiosis vs. Pathobiont Selection. **Frontiers in Immunology**. 2015 Nov 19;6:555. Disponível em:<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00555/full>>.

CARUSO R, LO BC, NÚÑEZ G. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. **Nature Review Immunology**. 2020;20(7):411-426. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32005980/>>.

CASTRO-DOPICO T, *et al.* Anti-commensal IgG Drives Intestinal Inflammation and Type 17 Immunity in Ulcerative Colitis. **Immunity**. 2019 Apr 16;50(4):1099-1114.e10. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8081991/>>.

CHISTIAKOV DA, *et al.* Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. **Frontiers in Microbiology**. 2015 Jan 13;5:781. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4292724/>>.

CISALPINO D, *et al.* Microbiota-Induced Antibodies Are Essential for Host Inflammatory Responsiveness to Sterile and Infectious Stimuli. **Journal of Immunology**. 2017 May 15;198(10):4096-4106. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28424241/>>.

CLEMENTE JC, *et al.* The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**. 2012 16;148(6):1258-70. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22424233/>>.

CLEYNEN I, *et al.* Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. **Lancet**. 2016 Jan 9;387(10014):156-67. Disponible em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26490195/>>.

CORNICK S, *et al.* VAMP8-mediated MUC2 mucin exocytosis from colonic goblet cells maintains innate intestinal homeostasis. **Nature Communications**. 2019 Sep 20;10(1):4306. Disponible em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-11811-8>>.

CRYAN J.F. *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiology Review**. 2019 Oct 1;99(4):1877-2013. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31460832/>>.

DAËRON M. Fc receptors as adaptive immunoreceptors. **Current Topics Microbiology Immunology**. 2014;382:131-64. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120570/>>.

ECKBURG PB, *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**. 2005 10;308(5728):1635-8. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15831718/>>

FAGARASAN S, *et al.* Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. **Science**. 2002 Nov 15;298(5597):1424-7. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12434060/>>.

FAGUNDES CT, *et al.* Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system. **Microbes Infection**. 2011 Dec;13(14-15):1121-32. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21867769/>>.

HAND TW, *et al.* Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. **Science**. 2012 Sep 21;337(6101):1553-6. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4826740/>>.

HARRIS NL, *et al.* Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. **Journal of Immunology**. 2006 Nov 1;177(9):6256-62. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17056555/>>.

HOOPER, LV. & MACPHERSON AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Review Immunology**, v.10, n.3, p.159-69. 2010. Disponible em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20182457/>>.

JEFFREY J. *et al.* IgA responses to microbiota. **Immunity**. 2018 Aug 21; 49(2): 211–224. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30134201/> >.

JOLLER N, *et al.* Antibodies protect against intracellular bacteria by Fc receptor-mediated lysosomal targeting. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. 2010 Nov 23;107(47):20441-6. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21048081/>>.

KAIFU T, NAKAMURA A. Polymorphisms of immunoglobulin receptors and the effects on clinical outcome in cancer immunotherapy and other immune diseases: a general review. **International Immunology**. 2017 Jul 1;29(7):319-325. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28910969/>>.

KAMADA N, *et al.* Humoral Immunity in the Gut Selectively Targets Phenotypically Virulent Attaching-and-Effacing Bacteria for Intraluminal Elimination. **Cell Host Microbe**. 2015 May 13;17(5):617-27. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433422/>>.

KAMADA N, NÚÑEZ G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. **Gastroenterology**. 2014 May;146(6):1477-88. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24503128/> > .

KAMALIAN A, *et al.* Interventions of natural and synthetic agents in inflammatory bowel disease, modulation of nitric oxide pathways. **World Journal of Gastroenterology**. 2020 Jun 28;26(24):3365-3400. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32655263/> >.

KAYAMA H, OKUMURA R, TAKEDA K. Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. **Annual Review Immunology**. 2020 Apr 26;38:23-48. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32340570/>>.

KLEBANOFF CA, *et al.* Retinoic acid controls the homeostasis of pre-cDC-derived splenic and intestinal dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**. 2013 23;210(10):1961-76. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23999499/> >.

KNIGHTS D, *et al.* Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. **Gut**. 2013 Oct;62(10):1505-10. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24037875/> >.

KOLIOS G, *et al.* Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle, **Immunology**. 2004;113:427–437. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15554920/> >.

LIN CS, et al. Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. **Biomedical Journal**. 2014;37(5):259-68. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25179725/>>.

LITVAK Y, et al. Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction. **Current Opinion Microbiology**. 2017 Oct; 39:1-6. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28783509/>>.

LIU JZ, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. **Nat Genet**. 2015;47(9):979-986. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881818/>>.

LJUNG T, et al. Rectal nitric oxide as biomarker in treatment of inflammatory bowel disease: Responders versus nonresponders. **World Journal of Gastroenterology**. 2006;12(21):3386–3392. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4087870/>>.

LOTZ M, et al. Innate immune recognition on the intestinal mucosa. **International Journal Medical Microbiology**. 2007 ;297(5):379-92. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17459768/>>

LYCKE NY, BEMARK M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. **Mucosal Immunology**. 2017 Nov;10(6):1361-1374. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28745325/>>.

MACPHERSON AJ, et al. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**. 2000 Jun 23;288(5474):2222-6. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10864873/>>.

MACPHERSON AJ, HARRIS NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**. 2004 Jun;4(6):478-85. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15173836/>>.

MADIGAN, M T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14º Ed. Artmed. 2016.

MAHOWALD MA, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. **Proceedings of the National Academy Science United States of America**. 2009 7;106(14):5859-64. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19321416/>>.

MANICHANH C, BORRUEL N, CASELLAS F, GUARNER F. The gut microbiota in IBD. **Nature Reviews Gastroenterology Hepatology**. 2012;9(10):599-608. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22907164/>>

MARANDUBA CM, *et al.* Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis. **Journal of Immunology Research**. 2015;2015:931574. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/PMC/4352473>>.

MCCOY KD, *et al.* Host-microbiota interactions and adaptive immunity. **Immunology Review**. 2017 Sep;279(1):63-69. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28856735/>>.

MCGOVERN DP, *et al.* Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**.2015;149(5):1163-1176.e2. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26255561/>>.

MEHTA M, AHMED S, DRYDEN G. Immunopathophysiology of inflammatory bowel disease: how genetics link barrier dysfunction and innate immunity to inflammation. **Innate Immunity**. 2017 Aug;23(6):497-505. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28770665/>>.

MILANI C, *et al.* The human gut microbiota and its interactive connections to diet. **J Hum Nutr Diet**. 2016 10. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27161433/>>.

MILANI C, *et al.* The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiology Molecular Biology Review**. 2017 Nov 8;81(4):e00036-17. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29118049/>>.

MURPHY, KENNETH, *et al.* **Imunobiologia de Janeway** - 8ª Ed. Artmed 2014.

NG SC, *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **Lancet** 2017; 390: 2769–2778. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29050646/>>.

NIMMERJAHN F, RAVETCH JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nature Review Immunology**. 2008 Jan;8(1):34-47. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18064051/>>.

NOAH W. *et al.* Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease **Cell**. 2015 Aug 28. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25171403/>>.

PALATKA K, *et al.* Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric oxide syn-thase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(6):670–80. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4124348/>>.

PANDA S, DING JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. **Journal of Immunology**. 2015 Jan 1;194(1):13-20. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25527792/>>.

PORTER RJ, et al. Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. *F1000Res*. 2020 Apr 24;9:F1000 Faculty Rev-294. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194476/>>.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ M, et al. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. **Inflammatory Bowel Disease**. 2013 Mar;19(3):481-8. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23385241/>>.

RAAT NJH, et al. Dietary nitrate and nitrite modulate blood and organ nitrite and the cellular ischemic stress response. **Free Radical Biology and Medicine**. 2009. Sep 1;47(5):510–7. 10.1016. Disponible em: <<https://europepmc.org/article/pmc/pmc2744499>>.

RENGARAJAN, S., et al. Dynamic immunoglobulin responses to gut bacteria during inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, 1–16.2019. Disponible em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31203722/>>.

ROLHION N, CHASSAING B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. **PhilosTrans R SocLond B BiolSci**. 2016 Nov 5;371(1707). pii:20150504. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27672153/>>.

ROSADO MM, et al. From the fetal liver to spleen and gut: the highway to natural antibody. **Mucosal Immunology**. 2009 Jul;2(4):351-61. Disponible em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19421184/>>.

ROUND, J. L. & MAZMANIAN S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Review Immunology**, v.9, n.5, p.313-23. 2009. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19343057/>>.

RUTTEN NB, et al. Intestinal microbiota composition after antibiotic treatment in early life: the INCA study. **BMC Pediatric**. 2015 Dec 9; 15:204. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26645894/>>.

SABAT R, et al. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. **Nature Review Drug Discovery**. 2014 Jan;13(1):21-38. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24378801/>>.

SASSONE-CORSI M. & RAFFATELLU M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. **J Immunol**. 2015 May 1;194(9):4081-7. Disponible em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25888704/>>.

SAULNIER DM, et al. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. **Gut Microbes**. 2013;4(1):17-27. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23202796/>>.

SHAH SC, et al. Sex-Based Differences in Incidence of Inflammatory Bowel Diseases- Pooled Analysis of Population-Based Studies From Western Countries. **Gastroenterology**. 2018 Oct;155(4):1079-1089.e3. Disponível em: <<https://m2.mtmt.hu/api/publication/3392078>>.

SHAW MH, et al. Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. **The Journal of Experimental Medicine**. 2012 Feb 13;209(2):251-8. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/209/2/251/41254/Microbiota-induced-IL-1-but-not-IL-6-is-critical>>.

SHEEHAN D & SHANAHAN F. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology Clinical North America**. 2017 Mar;46(1):143-154. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28164847/>>.

SHEN ZH, et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. **World Journal of Gastroenterology**. 2018 Jan 7;24(1):5-14. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29358877/>>.

SHIN NR, et al. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends Biotechnology**. 2015 Sep;33(9):496-503. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26210164/>>.

SINGER II, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**. 1996 Oct;111(4):871-85. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8831582/>>.

SMITH, K., et al. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Seminars Immunology**, v.19, n.2, p.59-69. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17118672/>>.

TISO M, SCHECHTER AN. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. **PLoS One**. 2015 Mar 24;10(3):e0119712. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25803049/>>.

TURNBAUGH PJ, et al. A core gut microbiome in obese and leantwins. **Nature**. 2009 22;457(7228):480-4. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature07540>>.

TURULA H, WOBUS CE. The Role of the Polymeric Immunoglobulin Receptor and Secretory Immunoglobulins during Mucosal Infection and Immunity. **Viruses**. 2018 May 3;10(5). Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29751532/>>.

VAN DER S M, *et al.* Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**. 2006 Jul;131(1):117-29. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16831596/>>.

VIEIRA AT, *et al.* Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **The American Journal of Pathology**. 2009 Dec;175(6):2382-91. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19893035/>>.

WINTER SE, BÄUMLER AJ. Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. **Gut Microbes**. 2014;5(1):71-3. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24637596/>>.

WINTER SE, *et al.* Host-derived nitrate boosts growth of E. coli in the inflamed gut. **Science**. 2013 Feb 8;339(6120):708-11. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23393266/>>.

ZENG MY, *et al.* Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. **Immunity**. 2016 Mar 15;44(3):647-658. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26944199/>>.

ZHANG YJ, *et al.* Impacts of gut bacteria on human health and diseases. **International Journal of Molecular Science**. 2015 Apr 2;16(4):7493-519. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25849657/>>.

ZHENG. D. *et al.* Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**. 2020. Res 30, 492–506. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41422-020-0332-7>>.